

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.003441

白藜芦醇改善多囊卵巢综合征模型大鼠卵巢颗粒细胞 线粒体功能和抑制凋亡的作用

胡 俊, 马 智, 张洪英, 王炼炼

(重庆医科大学附属第一医院生殖医学中心, 重庆 400016)

【摘要】目的:观察白藜芦醇对多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)模型大鼠卵巢颗粒细胞增殖和凋亡的影响以及线粒体的形态和功能的改变,并探讨其可能的保护机制。**方法:**32只雌性SD大鼠幼鼠随机分为2组,PCOS模型组($n=24$)和模型对照组($n=8$)。成功提取PCOS组颗粒细胞并体外培养,然后用不同浓度的白藜芦醇处理颗粒细胞,CCK-8法检测细胞活力的变化;Mito Tracker Deep Red染色观察细胞线粒体的形态变化;JC-1检测线粒体膜电位的变化;ATP检测试剂盒检测ATP的变化;分光光度计检测与凋亡密切相关caspase-3和caspase-9酶活性变化;最后,蛋白免疫印迹法检测颗粒细胞内caspase-3和caspase-9蛋白水平的变化。**结果:**白藜芦醇处理PCOS模型大鼠卵巢颗粒细胞后,颗粒细胞的增殖活性明显增强($P=0.000$);Mito Tracker Deep Red染色结果显示线粒体质量明显增加,形状呈管状或长条状;颗粒细胞内ATP产量和线粒体膜电位也明显增加($P=0.000$ 、 $P=0.000$)。另外,白藜芦醇也降低了caspase-3和caspase-9酶活性和蛋白水平的表达($P=0.000$ 、 $P=0.000$)。**结论:**白藜芦醇抑制了PCOS模型大鼠卵巢颗粒细胞的凋亡,也促进了细胞的增殖,其机制与白藜芦醇改善颗粒细胞线粒体的形态和功能有关。

【关键词】白藜芦醇;颗粒细胞;线粒体;凋亡**【中图分类号】**R737.31**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2023-06-29

Effects of resveratrol on improving mitochondrial function and inhibiting cell apoptosis in ovarian granulosa cells in a rat model of polycystic ovary syndrome

Hu Jun, Ma Zhi, Zhang Hongying, Wang Lianlian

(Center for Reproductive Medicine, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To observe the effects of resveratrol on the proliferation and apoptosis of ovarian granulosa cells (OGCs) and the changes in the morphology and function of mitochondria in a rat model of polycystic ovary syndrome (PCOS), and explore its possible protective mechanism. **Methods:** Thirty-two young female Sprague-Dawley rats were randomly divided into two groups: polycystic ovary syndrome model group ($n=24$) and model control group ($n=8$). Granulosa cells were extracted from the PCOS group and cultured *in vitro*, and treated with different concentrations of resveratrol. CCK-8 assay was used to measure the changes in cell activity; Mito Tracker Deep Red staining was used to observe the morphological changes in cell mitochondria; JC-1 was used to measure the changes in mitochondrial membrane potential; ATP kits were used to determine the changes in ATP content; spectrophotometry was used to measure the changes in enzymatic activity of caspase-3 and caspase-9, which are closely associated with apoptosis; finally, Western blot was used to measure the changes in the levels of caspase-3 and caspase-9 proteins. **Results:** After treatment with resveratrol, the OGCs in the rat model of PCOS showed a significant increase in proliferation activity ($P=0.000$). Mito Tracker Deep Red staining showed a significant increase in mitochondrial mass, with tubular or elongated shapes observed. ATP production and mitochondrial membrane potential in granulosa cells also significantly increased (both $P=0.000$). In addition, resveratrol reduced the enzymatic activity and protein expression of caspase-3 and caspase-9 (both $P=0.000$). **Conclusion:** Resveratrol inhibits the apoptosis of OGCs and

promotes cell proliferation in the rat model of PCOS, which is associated with the improvement of mitochondrial morphology and function of granulosa cells by resveratrol.

【Key words】resveratrol; granular cell; mitochondrion; apoptosis

作者介绍: 胡 俊, Email: 422054313@qq.com,

研究方向: 生殖内分泌。

通信作者: 王炼炼, Email: 343650062@qq.com。

优先出版: <https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20240328.0935.002>

(2024-03-31)

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 是育龄期妇女最常见的内分泌疾病之一,影响着该人群中大约 10%~15% 的妇女^[1]。PCOS 具有明显的 2 个特征:雄激素过量和排卵功能障碍;而临床上则表现为高雄激素血症、月经不调等^[2]。在形态学上,PCOS 多表现为卵巢呈多囊,也可见幼稚卵泡、多发性的囊泡囊肿等^[3]。大多数 PCOS 患者多伴有肥胖和胰岛素抵抗,同时还增加了其他多种共病的风险,如 2 型糖尿病^[4]、心血管疾病^[5]和晚期子宫内膜癌^[6]等。PCOS 发病机制尚不清楚,遗传和表现遗传因素,各种环境风险因素,如不健康的饮食和不良的生活习惯,这些都可能引起 PCOS^[7]。

线粒体是非常重要的双层膜、动态的、半自主性细胞器,由外膜、膜间隙和内膜组成。线粒体通过融合和分裂两种方式维持其结构完整性,以发挥其生物学功能。线粒体是体内的“能量工厂”,可通过氧化磷酸化产生 ATP,以提供生命活动所需能量;线粒体还参与体内的细胞增殖凋亡、自噬、氧化应激等多种生理活动。因此,线粒体正常的结构和功能对维持机体的多种生命活动至关重要^[8]。大量证据表明,线粒体功能障碍与 PCOS 的病理生理过程有着重要的密切的联系,如线粒体基因组异常、能量失衡、氧化应激、钙稳态失衡、动力学异常、生物合成减少等^[9-10]。因此,改善线粒体功能障碍将会对未来治疗 PCOS 有重要意义。

天然多酚类化合物白藜芦醇 (3,4,5-三羟基-反式二苯乙烯, resveratrol, Res) 作为一种减少肥胖和相关代谢障碍的治疗策略,引起了人们的极大兴趣。白藜芦醇主要存在于膳食植物中,包括虎杖、花生和葡萄皮的根等。Res 具有多种药理作用,包括抗炎、抗氧化、抗肿瘤和增加胰岛素敏感性等^[11-12]。临床和动物研究表明,白藜芦醇可以改善代谢功能障碍引起的月经异常、痤疮、脱发以及 PCOS 中的高雄激素血症^[13];此外,Res 对卵泡发育也有积极影响,如闭锁卵泡数量减少,卵巢卵泡储备增加,卵巢寿命延长^[14-15]。然而,Res 对 PCOS 卵巢颗粒细胞的线粒体形态和功能有何影响却鲜有报道。为此,本研究通过构建 PCOS 大鼠模型,分离得到卵巢颗粒细胞,并给予 Res 处理,观察 Res 对颗粒细胞线粒体形态和功能的影响,并探讨其发挥作用的机制,为治疗 PCOS 提供新的思路和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 20 日龄雌性 SD 大鼠 32 只,体质量约 50 g,由

重庆医科大学实验动物研究中心提供,合格证号:SCXK(渝)2016-0001。所有大鼠均置于 SPF 级代养室饲养,每笼 4 只,温度保持为 $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$,12 h 光照昼夜循环,给予常规鼠粮和水,术前 12 h 禁食。

1.1.2 主要试剂 高糖 F-12 培养液、胎牛血清、青霉素/链霉素、二甲基亚砜、SDS-PAGE 试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒 JC-1 等购自北京博奥森生物技术有限公司;白藜芦醇购自 Sigma 公司;BCA 蛋白浓度检测试剂盒、ATP 检测试剂盒等购自碧云天生物技术有限公司;CCK-8 试剂盒、caspase-3 和 caspase-9 酶活性检测试剂盒购自凯基公司;抗体 caspase-3、caspase-9 和内参 β -actin 购自博士德生物公司。聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜和电化学发光 (electro-chemi-luminescence, ECL) 试剂盒购自美国 Bio-rad 公司;Mito Tracker Deep Red 购自碧云天生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 Res 溶液配置和处理 称取 100 mg Res,以 DMSO 溶解,并加入三蒸水使其浓度为 1.0 mmol/L,过滤后 -20°C 保存。药物处理时,将 Res 母液分别加入 4 mL 培养液中,使得白藜芦醇的工作液浓度分别为 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.2.2 动物模型的建立 PCOS 模型鼠 ($n=24$) 的建立采用本课题组一直采用的方法,如下:大鼠麻醉后,于颈背部皮下注射脱 0.2 mL 芝麻油剂和氢表雄酮 6 mg/100(g·d),然后在腹部皮下注射诺和 N 2 IU/d。模型对照组 ($n=8$) 直接采取背部皮下注射注射 0.2 mL 芝麻油,均连续注射 35 d 后停药^[16]。

1.2.3 卵巢颗粒细胞的收集和培养 PCOS 大鼠模型成功建立后处死 SD 大鼠,取出卵巢并小心剥离其周围的脂肪组织等,生理盐水、PBS 缓冲液冲洗后剥离囊状卵泡;再次冲洗,刺破卵泡,释放卵巢颗粒细胞;用 200 目细胞筛将卵泡膜滤出,1 500 r/min \times 5 min,弃上清;再次 1 500 r/min \times 5 min,弃上清后用含有 1% 青霉素/链霉素和 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基悬浮细胞,并均匀接种于培养瓶中,置入 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养。卵巢颗粒细胞的鉴定用免疫细胞化学法^[17]。

1.2.4 CCK-8 将颗粒细胞按每孔 5 000 个细胞接种于 96 孔板中,置 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养,用不同浓度 (5、10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$) Res 处理该细胞,作用 48 h,并设空白对照组和溶剂对照组即 DMSO 组 (浓度为 0.1%),每组设 5 个复孔。每孔加入 20 μL 的 CCK-8 溶液,继续培养 1 h,用酶标仪上检测其 450 nm 处的吸光度 (absorbance, A) 值,并按下列公式计算白藜芦醇对颗粒细胞的增殖率的影响:颗粒细胞增殖率 (%) = (实验组吸收值 $A_{450\text{nm}}$ - 空白对照吸收值 $A_{450\text{nm}}$) / (对照组吸收值 $A_{450\text{nm}}$ - 空白对照吸收值 $A_{450\text{nm}}$) \times 100%。

1.2.5 线粒体膜电位检测 采用流式细胞法。将颗粒细胞接种于 24 孔板中,密度为 5×10^5 个/孔。分别给予溶剂 DMSO 和 5、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 的 Res 处理。收集每组细胞悬液至无菌 EP 管中;离心 400 g \times 5 min,洗掉上清;用 0.5 mL JC-1 工作液悬浮细胞,于 37°C 、5% CO_2 培养箱孵育 15~30 min;离心 400 g \times 5 min,洗掉上清;用 2 mL 细胞培养液重悬细胞,离心 400 g \times 5 min,吸掉上清;再次用 2 mL 细胞培养液重悬细胞,离心 400 g \times 5 min,吸掉上清;用 0.5 mL 新鲜培养液重悬细胞,即可进行后续的流式分析。

1.2.6 Mito Tracker Deep Red 染色-线粒体红色荧光探针分组同上:为溶剂 DMSO 对照组和 5、20、40 $\mu\text{mol/L}$ Res 处理组。配置 Mito Tracker Deep Red 储存液工作液,并避光保存。将贴壁的颗粒细胞接种于培养板中,RES 处理后加入 Mito Tracker Deep Red 工作液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15~30 min;去除 Mito Tracker Deep Red 工作液,加入 37 $^{\circ}\text{C}$ 预温育的新鲜细胞培养液;然后用激光共聚焦显微镜进行观察。

1.2.7 ATP 含量检测 分组同上:溶剂 DMSO 对照组和 5、20、40 $\mu\text{mol/L}$ Res 处理组。采用 ATP 检测试剂盒,简单步骤如下:准备试剂、样品和制备标准品;分别设空白孔、标准孔、待测样品孔。在酶标包被板上加样标准品 50 mL,待测样品孔中加样品稀释液 40 mL 和待测样品 10 mL(样品最终稀释度为 5 倍)轻轻晃动混匀;温育:用封板膜封板后置 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min;洗涤:小心揭掉封板膜,弃去液体,甩干,每孔加满洗涤液,静置 30 s 后弃去,如此重复 5 次,拍干;加酶:每孔加入酶标试剂 50 mL,空白孔除外;再次孵育和洗涤后显色:每孔先加入显色剂 A 50 mL,再加入显色剂 B 50 mL,轻轻震荡混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光显色 15 min;终止:每孔加终止液 50 mL,终止反应并进行测定(450 nm 波长依序测量各孔的 A 值)。

1.2.8 Caspase3 和 caspase9 的活性检测 分组同上,为溶剂 DMSO 对照组和 5、20、40 $\mu\text{mol/L}$ Res 处理组。收集 Res 处理后的各组颗粒细胞后,用 PBS 洗涤细胞 2 次(离心 2 000 r/min, 5 min),收集 $(3\sim5) \times 10^6$ 个细胞;在沉淀的细胞中加入 200 μL 冰冷 Lysis Buffer 吹打均匀;置冰上裂解 20 min,涡旋振荡 4 次,每次 10 s;4 $^{\circ}\text{C}$,离心 10 000 r/min \times 1 min;小心吸取上清,转移至新的管中,并放置冰上待用;测定其中的蛋白浓度;吸取 50 μL 含 100~200 μg 蛋白的细胞样品加入 50 μL 的 2 \times Reaction Buffer,再加入 5 μL Caspase-3 Substrate,充分混匀后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 4 h;酶标仪在 $\lambda=405$ nm 测定其 A 值。通过计算 $A_{\text{Res}}/A_{\text{对照}}$ 的倍数来确定其活性的大小变化。Caspase-9 方法同 caspase-3。

1.2.9 Western blot 收集各组颗粒细胞,加入 1 mL 蛋白裂解液,充分裂解后于 4 $^{\circ}\text{C}$,13 000 r/min \times 15 min 离心后,用 Bradford 法测定每组蛋白样品浓度并分装保存。配置 8%~10% 的 Page 胶,上样 40 μg 经 SDS-PAGE 电泳,将蛋白电转至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,然后置入 TBST 稀释的抗体 caspase-3、caspase-9 和 β -actin,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;充分洗涤后加入 1:5 000 的 HRP 标记的羊抗兔二抗,室温孵育 2 h,最后用 ECL 发光试剂盒行曝光显影,经 Bio-rad Chemical Dox XRS 凝胶成像系统进行条带的分析。

1.3 统计学方法

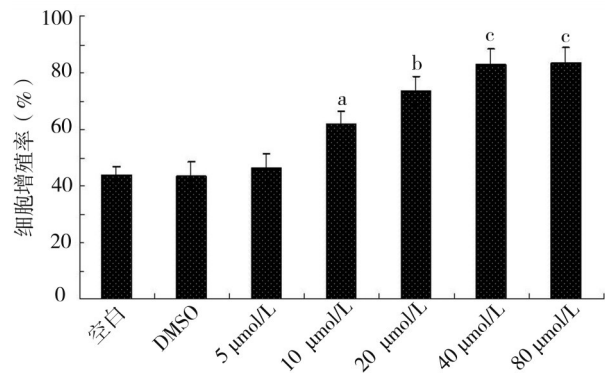
应用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,所有计量资料均采用均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK- q 。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 Res 促进卵巢颗粒细胞的增殖

Res 促进卵巢颗粒细胞的增殖实验中,空白对照组、溶剂 DMSO 组和 5、10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 的 Res 处理的颗粒细

胞的增殖率分别为: 42.3 ± 1.06 、 41.2 ± 1.40 、 45.5 ± 1.35 、 61.2 ± 1.92 、 71.9 ± 1.81 、 81.5 ± 0.737 和 82.5 ± 1.70 ,7 组比较差异有统计学意义 ($F=449.368$, $P=0.000$)。进一步两两比较:与空白对照组和 DMSO 处理组比较,5 $\mu\text{mol/L}$ Res 处理颗粒细胞 48 h 后,颗粒细胞的增殖率差异无统计学意义 ($P=0.068$, $P=0.063$),空白对照组和 DMSO 处理组比较颗粒细胞的增殖率差异无统计学意义 ($P=0.394$),40 和 80 $\mu\text{mol/L}$ 比较组颗粒细胞的增殖率差异无统计学 ($P=0.438$),其余各比较组两两比较差异均有统计学意义 ($P<0.05$) (图 1)。



注:a,与空白组比较, $P<0.05$;b,与 10 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, $P<0.05$;c,与 20 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, $P<0.05$ ($n=3$)

图1 Res 促进了 PCOS 模型鼠卵巢颗粒细胞的增殖

2.2 Res 维持了卵巢颗粒细胞线粒体质量

为了更好地表征线粒体的存在,本研究利用 Mito Tracker Deep Red 染色通过共聚焦显微镜分析了它们的形态和质量的变化。如图 2 所示,在 PCOS 卵巢颗粒细胞 DMSO 处理后发现,线粒体的质量明显减少,呈现小的碎片状;5 $\mu\text{mol/L}$ Res 处理后,线粒体的质量变化无明显改变;当 Res 浓度增加至 20 $\mu\text{mol/L}$ 和 40 $\mu\text{mol/L}$ 后,线粒体的质量明显增加,呈现出管状或长条状。

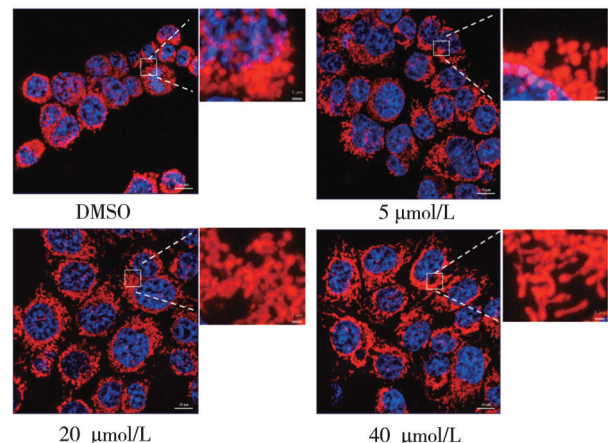
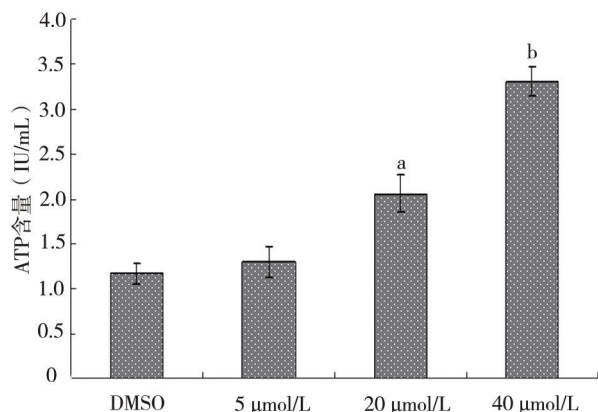


图2 Res 维持了 PCOS 卵巢颗粒细胞中线粒体的质量

2.3 Res 增加了卵巢颗粒细胞内 ATP 的生成

溶剂 DMSO 组和 5、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 的 ATP 含量分别为: 1.170 ± 0.080 、 1.240 ± 0.0917 、 2.233 ± 0.1210 、 3.243 ± 0.050 ,

4 组比较差异有统计学意义 ($F=358.325, P=0.000$)。进一步两两比较: 与 DMSO 处理组比较, 当 Res 浓度为 $5 \mu\text{mol/L}$ 时, 卵巢颗粒细胞内产生的 ATP 含量无显著增加, 无统计学意义 ($P=0.366$); 当浓度增加至 $20 \mu\text{mol/L}$ 和 $40 \mu\text{mol/L}$ 时, 颗粒细胞产生的 ATP 明显增加, 差异具有统计学意义 ($P=0.000$ 和 $P=0.000$); 与 $20 \mu\text{mol/L}$ 比较, $40 \mu\text{mol/L}$ 的颗粒细胞产生的 ATP 明显增加, 差异具有统计学意义 ($P=0.000$) (图 3)。



注: a, 与 DMSO 组比较, $P<0.05$; b, 与 DMSO 组比较, $P<0.05$ ($n=3$)

图 3 Res 增加了 PCOS 卵巢颗粒细胞 ATP 的含量

2.4 Res 提升了卵巢颗粒细胞线粒体膜电位

阳离子脂质荧光染料 JC-1 是检测线粒体跨膜电位指示剂, 有单体和多聚体 2 种形式。前者在流式细胞仪中绿色 (FL-1) 通道检测出绿色荧光; 而后者多聚体在 FL-2 通道检测出现红色荧光。当线粒体膜电位降低时, 线粒体膜电位被去极化, JC-1 从线粒体内释放, 红光强度减弱, 主要以单体的形式存在于胞质内发绿色荧光。因此, 根据这一特征检测线粒体膜电位的变化, 以显示细胞的凋亡水平变化。溶剂 DMSO 组和 $5, 20, 40 \mu\text{mol/L}$ 的膜电位分别为: $12.050 \pm 0.18735, 13.92870 \pm 0.95142, 29.23330 \pm 0.54501, 60.98000 \pm 2.92009$, 4 组比较差异有统计学意义 ($F=623.988, P=0.000$)。进一步两两比较: 与 DMSO 处理组比较, 当 Res 浓度为 $5 \mu\text{mol/L}$ 时, 颗粒细胞的膜电位没有明显改变, 无统计学意义 ($P=0.179$); 当浓度增加至 $20 \mu\text{mol/L}$ 和 $40 \mu\text{mol/L}$ 时, 颗粒细胞的膜电位明显增加, 差异具有统计学意义 ($P=0.000$ 和 $P=0.000$); 与 $20 \mu\text{mol/L}$ 比较, $40 \mu\text{mol/L}$ 的颗粒细胞膜电位显著增加, 差异具有统计学意义 ($P=0.000$) (图 4, $n=3$)。

2.5 Res 降低了 PCOS 卵巢颗粒细胞内 caspase-3 和 caspase-9 的酶活性和蛋白的表达

如图 5, 溶剂 DMSO 组和 $5, 20, 40 \mu\text{mol/L}$ 的 caspase-3 酶活性和 caspase-9 酶活性的相对值分别为: $5.63330 \pm 0.28537, 5.65670 \pm 0.29280, 3.267 \pm 0.16010, 2.80330 \pm 0.14815$ 及 $4.59330 \pm 0.09292, 4.48670 \pm 0.10017, 3.65670 \pm 0.07572, 2.52330 \pm 0.04163$, 4 组比较差异有统计学意义 ($F_1=120.383, P_1=0.000; F_2=420.981, P_2=0.000$)。进一步两两比较: 与 DMSO 处理组比较, 当 Res 浓度为 $5 \mu\text{mol/L}$ 时, 卵巢颗粒细胞的 caspase-3 酶活性和 caspase-9 酶活性没有明显改

变, 差异无统计学意义 ($P_1=0.907, P_2=0.145$); 当浓度增加至 $20 \mu\text{mol/L}$ 和 $40 \mu\text{mol/L}$ 时, 颗粒细胞的凋亡明显抑制, 差异具有统计学意义 ($P_1=0.000, P_2=0.000$); 与 $20 \mu\text{mol/L}$ 比较, $40 \mu\text{mol/L}$ 的颗粒细胞凋亡率明显减少, 差异具有统计学意义 ($P_1=0.000, P_2=0.027$)。

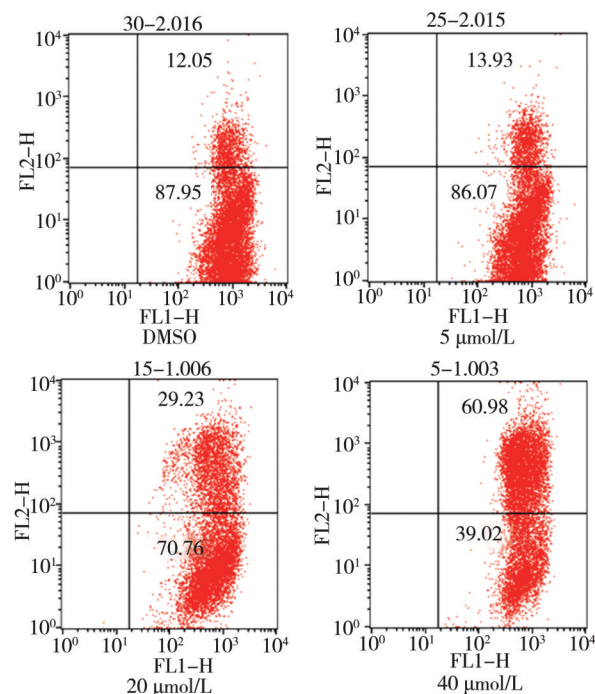
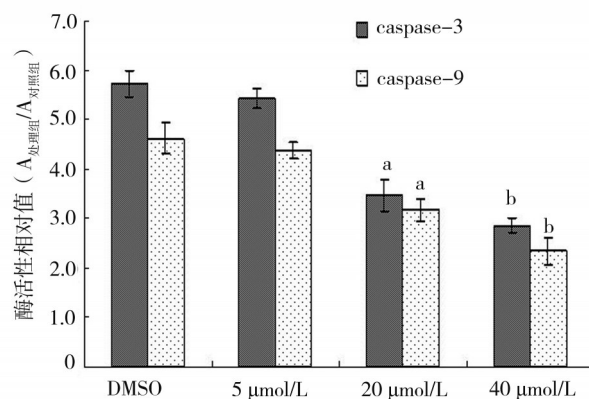


图 4 Res 提升了卵巢颗粒细胞线粒体膜电位

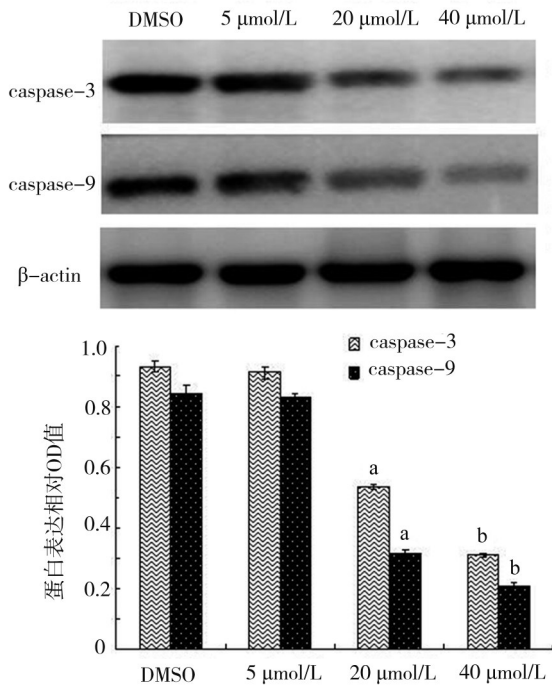


注: a, 与 DMSO 组比较, $P<0.05$; b, 与 $20 \mu\text{mol/L}$ 组比较, $P<0.05$ ($n=3$)

图 5 Res 抑制了 PCOS 卵巢颗粒细胞 caspase-3 和 caspase-9 的酶活性

如图 6, 溶剂 DMSO 组和 $5, 20, 40 \mu\text{mol/L}$ 的 caspase-3 和 caspase-9 蛋白表达的相对值分别为: $0.911670 \pm 0.015500, 0.917330 \pm 0.012633, 0.557670 \pm 0.011015, 0.298330 \pm 0.017243$ 及 $0.852330 \pm 0.009609, 0.814000 \pm 0.014107, 0.289670 \pm 0.010017, 0.206670 \pm 0.013204$, 4 组比较差异有统计学意义 ($F_1=319.732, P_1=0.000; F_2=2448.086, P_2=0.000$)。进一步两两比较: 与 DMSO 处理组比较, 当 Res 浓度

为 5 $\mu\text{mol/L}$ 时, 卵巢颗粒细胞的 caspase-3 和 caspase-9 蛋白表达没有明显改变, 无统计学意义 ($P_1=0.641$ 、 $P_2=0.704$); 当浓度增加至 20 $\mu\text{mol/L}$ 和 40 $\mu\text{mol/L}$ 时, 颗粒细胞的蛋白表达明显抑制, 具有统计学意义 ($P_1=0.000$ 、 $P_2=0.000$); 与 20 $\mu\text{mol/L}$ 比较, 40 $\mu\text{mol/L}$ 的颗粒细胞凋亡率明显减少, 差异具有统计学意义 ($P_1=0.000$ 、 $P_2=0.000$)。



注: a, 与 DMSO 组比较, $P<0.05$; b, 与 20 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, $P<0.05$ ($n=3$)

图6 Res抑制了PCOS卵巢颗粒细胞caspase-3和caspase-9蛋白表达水平

3 讨论

卵泡发育障碍既是 PCOS 重要的临床特征之一, 也是 PCOS 主要的病理学改变。卵泡发育障碍多变现为多囊状态, 卵巢皮质增厚、黄体化内鞘、基质增生、多发小囊泡以及多发未成熟的卵泡^[18]。卵泡主要由卵母细胞、颗粒细胞和卵泡膜细胞组成, 其中, 颗粒细胞是围绕在卵母细胞周围的一类体细胞, 它与膜细胞相互作用是卵泡发育和维持正常功能的重要条件。颗粒细胞的生长和发育, 功能和数量的变化都直接影响着卵母细胞的发育、排卵、受精以及胚胎着床等过程, 是卵泡发育的重要标志。目前, 在生殖医学中评估卵母细胞质量以及发育动力学相关的信息量有限, 加之获取方式的局限性, 而颗粒细胞的获取相对容易, 且对卵泡发育有着重要意义, 因此评估颗粒细胞的形态和功能就显得尤其重要。

线粒体是重要的细胞器之一, 是物质代谢和能量代谢的重要场所。线粒体富含于颗粒细胞中, 它的数量、形态和功能不仅直接影响着颗粒细胞的生长、分化、代谢、细胞周期以及信号转导等过程, 还影响着卵母细胞和胚胎的质量。线粒体一旦发生异常可影响正常的颗粒细胞的功能, 甚至导致颗粒细胞凋亡或死亡。研究已发现, 在 PCOS 模型中, 颗粒细胞内出现了明显的线粒体嵴肿胀、消失、膜破裂和空泡等变化, 甚至还出现线粒体分裂与融合动态失衡等。本实验中, 通过注射氢表雄酮和诺和 N 构建了 PCOS 的大鼠模型, 并成功获取了颗粒细胞, 发现颗粒细胞中存在着大量线粒体损伤的表现: Mito Tracker Deep Red 染色后线粒体数量变少, 质量较小, 且呈碎片状; 膜电位下降, 发生去极化; 颗粒细胞中 ATP 的生成量也下降, 颗粒细胞的增殖率也降低。线粒体数量变少、质量减小以及呈碎片状是由于 PCOS 造成了线粒体从正常的豆状变成球状, 并出现线粒体嵴的断裂、消失, 甚至线粒体损失等; ATP 生成量下降是由于线粒体的数量和形态的改变必然导致功能的改变, 而能量代谢是线粒体的重要功能, ATP 又是最重要能量形式, 是生物体内最直接的能量来源, 因此 ATP 生成必然下降。另外, 线粒体是调控凋亡的重要场所, 线粒体介导的细胞凋亡途径也是真核细胞凋亡的重要途径。一旦细胞线粒体受到损伤, 其功能就会发生异常, 比如引起氧化呼吸链的改变和活性氧等异常, 进而引起氧化应激等导致凋亡的发生, 表现为膜电位下降, 与凋亡密切相关的 caspase-3 和 caspase-9 的酶活性和蛋白表达水平都处于高水平状态。当大量颗粒细胞发生凋亡后, 其增殖也可能受到影响。

研究表明, 多数植物提取物对 PCOS 动物模型都有较明显的治疗效果, 如姜黄素^[19]、EGCG^[20]等, 这些化合物大多具有多机制、多靶点、低毒副作用, 因此吸引了生殖医学临床医生的目光。Res 也是一种天然的多酚类植物化合物, 也可通过多靶点、多通路地发挥其广泛的药理作用^[21-22]。大量研究证实, Res 可通过调节线粒体功能而发挥其抗肿瘤^[23]、抗免疫应激^[24]、抗急性损伤^[25]等功能, 但对 PCOS 的颗粒细胞的线粒体是否也具有保护功能却报道甚少。本研究结果表明, Res 作用于 PCOS 大鼠模型颗粒细胞后, 颗粒细胞的增殖率明显提升, 且呈浓度依赖性。结果还表明, Res 对颗粒细胞中线粒体的形态和功能都有明显的改善作用: Mito Tracker Deep Red 染色后发现线粒体的数量增加, 质量增加, 其形态

也从碎片状恢复至条状或管状;随着形态和数量的恢复,线粒体的功能也有显著改善,颗粒细胞内产生的 ATP 量增多,线粒体介导的凋亡水平也受到了抑制,表现为线粒体去极化也逐渐减弱,膜电位得到提高,caspase-3 和 caspase-9 的酶活性和蛋白表达水平都明显降低。这说明 Res 可抑制 PCOS 模型颗粒细胞线粒体损伤诱导的细胞的凋亡。

综上所述,Res 可通过改善 PCOS 卵巢颗粒细胞中线粒体的形态和功能,抑制线粒体损伤所诱导的凋亡,同时也促进颗粒细胞的增殖,从而发挥其保护作用,这对深入探讨 Res 在 PCOS 中发挥保护作用的机制具有重要的意义,但仍需要进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Homburg R. Polycystic ovary syndrome – from gynaecological curiosity to multisystem endocrinopathy[J]. Hum Reprod, 1996, 11(1): 29–39.
- [2] Dumesic DA, Oberfield SE, Stener-Victorin E, et al. scientific statement on the diagnostic criteria, epidemiology, pathophysiology, and molecular genetics of polycystic ovary syndrome[J]. Endocr Rev, 2015, 36(5):487–525.
- [3] Ghafurniyan H, Azarnia M, Nabiuni M, et al. The effect of green tea extract on reproductive improvement in estradiol valerate-induced polycystic ovarian syndrome in rat[J]. Iran J Pharm Res, 2015, 14(4): 1215–1233.
- [4] Choudhury AA, Rajeswari VD. Polycystic ovary syndrome (PCOS) increases the risk of subsequent gestational diabetes mellitus (GDM): a novel therapeutic perspective[J]. Life Sci, 2022, 310: 121069.
- [5] Shawky NM. Cardiovascular disease risk in offspring of polycystic ovary syndrome[J]. Front Endocrinol, 2022, 13: 977819.
- [6] Shafiee MN, Ortori CA, Barrett DA, et al. Lipidomic biomarkers in polycystic ovary syndrome and endometrial cancer[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(13): 4753.
- [7] Siddiqui S, Mateen S, Ahmad R, et al. A brief insight into the etiology, genetics, and immunology of polycystic ovarian syndrome (PCOS) [J]. J Assist Reprod Genet, 2022, 39(11): 2439–2473.
- [8] Wang ZH, Chen L, Li W, et al. Mitochondria transfer and transplantation in human health and diseases[J]. Mitochondrion, 2022, 65: 80–87.
- [9] Shukla P, Mukherjee S, Patil A, et al. Molecular characterization of variants in mitochondrial DNA encoded genes using next generation sequencing analysis and mitochondrial dysfunction in women with PCOS [J]. Gene, 2023, 855: 147126.
- [10] Wang YS, Leung P, Li R, et al. Editorial: Polycystic ovary syndrome (PCOS): mechanism and management[J]. Front Endocrinol, 2022, 13: 1030353.
- [11] Mahjabeen W, Khan DA, Mirza SA. Role of resveratrol supplementation in regulation of glucose hemostasis, inflammation and oxidative stress in patients with diabetes mellitus type 2: a randomized, placebo-controlled trial[J]. Complement Ther Med, 2022, 66: 102819.
- [12] Jiang JY, Im E, Kim ND. Mechanism of resveratrol-induced programmed cell death and new drug discovery against cancer: a review[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(22): 13689.
- [13] Mansour A, Samadi M, Sanginabadi M, et al. Effect of resveratrol on menstrual cyclicity, hyperandrogenism and metabolic profile in women with PCOS[J]. Clin Nutr, 2021, 40(6): 4106–4112.
- [14] Liang Y, Xu ML, Gao X, et al. Resveratrol improves ovarian state by inhibiting apoptosis of granulosa cells[J]. Gynecol Endocrinol, 2023, 39(1): 2181652.
- [15] Jiang Y, Zhang ZY, Cha LJ, et al. Resveratrol plays a protective role against premature ovarian failure and prompts female germline stem cell survival[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(14): 3605.
- [16] Furat Rencher S, Kurnaz Ozbek S, Eraldemir C, et al. Effect of resveratrol and metformin on ovarian reserve and ultrastructure in PCOS: an experimental study[J]. J Ovarian Res, 2018, 11(1): 55.
- [17] 马智, 胡俊, 邓煜, 等. 白藜芦醇调节 AKT/MTOR 通路对大鼠多囊卵巢综合征颗粒细胞自噬的影响机制研究[J]. 重庆医科大学学报, 2021, 46(4): 388–393.
- [18] Ma Z, Hu J, Deng Y, et al. Effects of resveratrol on granulosa cell autophagy by regulating akt/mtor pathway in rats with polycystic ovarian syndrome[J]. J Chongqing Med Univ, 2021, 46(4): 388–393.
- [19] Murri M, Luque-Ramírez M, Insenser M, et al. Circulating markers of oxidative stress and polycystic ovary syndrome (PCOS): a systematic review and meta-analysis[J]. Hum Reprod Update, 2013, 19(3): 268–288.
- [20] Zhang YL, Wang L, Weng YJ, et al. Curcumin inhibits hyperandrogen-induced IRE1 α -XBP1 pathway activation by activating the PI3K/AKT signaling in ovarian granulosa cells of PCOS model rats [J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 2113293.
- [21] Hazimeh D, Massoud G, Parish M, et al. Green tea and benign gynecologic disorders: a new trick for an old beverage? [J]. Nutrients, 2023, 15(6): 1439.
- [22] Zheng MS, Bai YL, Sun XY, et al. Resveratrol reestablishes mitochondrial quality control in myocardial ischemia/reperfusion injury through Sirt1/Sirt3-Mfn2-parkin-PGC-1 α pathway[J]. Molecules, 2022, 27(17): 5545.
- [23] Mejía-Rodríguez R, Romero-Trejo D, González RO, et al. Combined treatments with AZD5363, AZD8542, curcumin or resveratrol induce death of human glioblastoma cells by suppressing the PI3K/AKT and SHH signaling pathways[J]. Biochem Biophys Rep, 2023, 33: 101430.
- [24] Ben-Zichri S, Rajendran S, Bhunia SK, et al. Resveratrol carbon dots disrupt mitochondrial function in cancer cells[J]. Bioconjug Chem, 2022, 33(9): 1663–1671.
- [25] Yoon J, Ku D, Lee M, et al. Resveratrol attenuates the mitochondrial RNA-mediated cellular response to immunogenic stress[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(8): 7403.
- [26] Sabry MM, Ahmed MM, Maksoud OMA, et al. Carnitine, apelin and resveratrol regulate mitochondrial quality control (QC) related proteins and ameliorate acute kidney injury: role of hydrogen peroxide[J]. Arch Physiol Biochem, 2022, 128(5): 1391–1400.

(责任编辑:李青颖)