

多囊卵巢综合征不孕患者颗粒细胞中PTEN mRNA表达水平 对卵泡液激素分泌的影响

姚建凤¹, 吴培雅¹, 陈丽影¹, 王燕婷¹, 凌幼霞¹, 陈晓燕¹, 陈婉真¹, 陶萍², 黄荣富³, 李友筑^{2,4}

(1. 华侨大学附属妇幼保健院 泉州市妇幼保健院 泉州市儿童医院妇科, 福建 泉州 362000; 2. 厦门大学附属第一医院生殖医学中心, 福建 厦门 361002; 3. 福建医科大学附属第二医院检验科, 福建 泉州 362000; 4. 中国农业大学动物科学技术学院动物遗传育种与繁殖系, 北京 100193)

[摘要] **目的:** 检测多囊卵巢综合征(PCOS)不孕患者卵泡液(FF)中性激素和胰岛素水平与颗粒细胞中人第10号染色体缺失的磷酸酶和张力蛋白同源物(PTEN)mRNA表达水平,并初步阐释胰岛素水平与PTEN mRNA表达水平的相关性。**方法:** 选取70例不孕患者作为研究对象,根据不孕因素,分为PCOS组 and 对照组(输卵管阻塞或男方因素不孕),所有患者均接受体外受精-胚胎移植(IVF-ET)治疗,在取卵当天收集患者FF和卵巢颗粒细胞,采用实时荧光定量PCR(RT-qPCR)法检测2组患者卵巢组织颗粒细胞中PTEN mRNA表达水平;采用电化学发光法检测2组患者FF中性激素和胰岛素水平;采用Spearman相关性分析法分析2组患者卵巢颗粒细胞中PTEN mRNA表达水平和FF中睾酮(T)水平与FF中胰岛素水平的相关性。**结果:** 2组患者年龄、不孕年限、体质量指数(BMI)、基础性激素、促性腺激素(Gn)总剂量和促排天数比较差异无统计学意义($P>0.05$);与对照组比较,PCOS组患者抗缪勒管激素(AMH)和窦卵泡计数(AFC)均明显升高($P<0.05$)。RT-qPCR法,PCOS组患者卵巢颗粒细胞中PTEN mRNA水平高于对照组($P<0.001$)。电化学发光法,PCOS组患者FF中T和胰岛素水平高于对照组($P<0.05$),雌激素和孕激素水平均低于对照组($P<0.05$)。Spearman相关性分析,PCOS组患者FF中T水平和卵巢颗粒细胞中PTEN mRNA表达水平与FF中胰岛素水平均呈正相关关系($r=0.577, P<0.001$; $r=0.616, P<0.001$),而对照组患者FF中T水平和卵巢颗粒细胞中PTEN mRNA表达水平与FF中胰岛素水平无相关性($r=0.266, P=0.123$; $r=-0.214, P=0.216$)。**结论:** PCOS不孕患者颗粒细胞中高表达PTEN可能与卵巢内局部高胰岛素水平有关,PTEN参与PCOS的发生发展过程。

[关键词] 多囊卵巢综合征; 卵泡液; 胰岛素; 颗粒细胞; 人第10号染色体缺失的磷酸酶和张力蛋白同源物基因

[中图分类号] R711.6 **[文献标志码]** A

[收稿日期] 2023-12-13 **[录用日期]** 2024-04-01

[基金项目] 福建省科技厅自然科学基金项目(2022J01771, 2022J011378);福建省卫健委中青年骨干人才培养项目(2019-ZQN-91);福建省厦门市科技局医疗卫生指导项目(3502Z20209010);华侨大学院校联合创新项目(2021YX004);福建省泉州市科技局科技计划项目([2004]0010和2023N042S)

[作者简介] 姚建凤(1982-),女,福建省泉州市人,副主任医师,医学博士,主要从事生殖与妇科内分泌方面的研究。

[通信作者] 黄荣富,副主任技师,副教授(E-mail: hrf55555@fjmu.edu.cn);

李友筑,副研究员,副教授,硕士研究生导师(E-mail: LYZART@xmu.edu.cn)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部,开放获取遵循CC BY-NC-ND协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

Effect of PTEN mRNA expression level in granulosa cells on follicular fluid hormone secretion in infertile patients with polycystic ovary syndrome

YAO Jianfeng¹, WU Peiya¹, CHEN Liying¹, WANG Yanting¹, LING Youxia¹, CHEN Xiaoyan¹,
CHEN Wanzhen¹, TAO Ping², HUANG Rongfu³, LI Youzhu^{2,4}

(1. Department of Gynecology, Affiliated Women's and Children's Hospital, Huaqiao University, Quanzhou Maternity and Child Healthcare Hospital, Children Hospital, Quanzhou 362000, China; 2. Department of Reproductive Medicine, First Affiliated Hospital, Xiamen University, Xiamen 361003, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Second Affiliated Hospital, Fujian Medical University, Quanzhou 362000, China; 4. Department of Animal Genetics, Breeding and Reproduction, College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

ABSTRACT Objective: To detect the levels of sex hormones and insulin in follicular fluid (FF) and the expression level of phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten (PTEN) in granulosa cells in the infertile patients with polycystic ovary syndrome (PCOS), and to preliminarily explain the correlations between the insulin level and the expression level of PTEN mRNA. **Methods:** Seventy infertile patients were selected as the subjects and divided into PCOS group and control group (tubal obstruction or infertility due to male factors) according to infertility factors. All patients received *in vitro* fertilization-embryo transfer (IVF-ET) treatment. FF and ovarian granulosa cells were collected on the day of ovulation. The expression levels of PTEN mRNA in ovarian granulosa cells of the patients in two groups were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method. The levels of sex hormone and insulin in FF were measured by electrochemiluminescence. The correlations of the PTEN mRNA expression level in ovarian granulosa cells and testosterone (T) in FF with the level of insulin in FF were analyzed by Spearman correlation analysis method. **Results:** There were no significant differences in age, infertility years, body mass index (BMI), basic sex hormone, total dose of gonadotropin (Gn) and days of ovulation induction in two groups ($P > 0.05$). Compared with control group, the anti-Müllerian hormone (AMH) and antral follicle counting (AFC) of the patients in PCOS group were significantly increased ($P < 0.05$). The RT-qPCR results showed that the PTEN mRNA expression level in ovarian granulosa cells of the patients in the PCOS group was higher than that in control group ($P < 0.001$). The electrochemiluminescence results showed that the levels of T and insulin in FF of the patients in PCOS group were higher than those in control group ($P < 0.05$), whereas the estrogen and progesterone levels were lower than those in control group ($P < 0.05$). The Spearman correlation analysis showed that T level in FF was positively correlated with the insulin level of the patients in PCOS group ($r = 0.577$, $P < 0.001$), and the PTEN mRNA expression level in ovarian granulosa cells was positively correlated with the insulin levels in FF ($r = 0.616$, $P < 0.001$); in control group, there was no correlation between T level and insulin level in FF ($r = 0.266$, $P = 0.123$), and there was no correlation between the expression level of PTEN mRNA in granulosa cells and the insulin level in FF in control group ($r = -0.214$, $P = 0.216$). **Conclusion:** The high expression of PTEN in granulosa cells of the infertile patients with PCOS may be related to the local hyperinsulin level in the ovary, and PTEN participates in the occurrence and development of PCOS.

KEYWORDS Polycystic ovary syndrome; Follicular fluid; Insulin; Granulosa cell; Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10

多囊卵巢综合征 (polycystic ovarian syndrome, PCOS) 是常见的卵泡发育障碍、代谢异常和内分泌

紊乱并存的临床综合征,其在育龄期女性中发生率为5%~10%,确切发病机制目前尚不清楚,一般认为是遗传、环境、生活习惯及膳食营养等多种因素共同作用的结果。目前,PCOS病因未明,无法治愈,对妇科内分泌医学领域是难题也是挑战。研究^[1-2]显示:在PCOS患者高胰岛素血症和高雄激素血症(hyperandrogenemia, HA)常相互伴发。研究^[3]发现:胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)的发生不仅导致代偿性高胰岛素血症,还影响生殖功能,对PCOS病理生理改变意义重大,IR促进PCOS的发生发展,但胰岛素及IR影响卵泡生长的分子机制尚不清楚。人第10号染色体缺失的磷酸酶和张力蛋白同源物(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10, PTEN)基因调控细胞生长发育、凋亡及信号转导等^[4],PTEN在磷脂酰肌醇3激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)信号通路中发挥非常有效的负调节作用,调控颗粒细胞的增殖和分化,进而影响卵泡发育^[4-5]。研究^[6-7]表明:PI3K/Akt信号通路是胰岛素调控糖代谢的重要通路,该信号通路活性下降可促进IR发生。抑癌基因PTEN在IR和卵泡发育过程中均可发挥作用,而PCOS患者的临床特征即卵泡发育障碍、临床/生化高雄表现以及代谢紊乱,目前关于PTEN是否参与PCOS的发病过程国内尚未见报道。本研究检测行体外受精-胚胎移植(*in vitro* fertilization-embryo transfer, IVF-ET)治疗的PCOS不孕患者促排卵治疗中卵泡液(follicular fluid, FF)中性激素和胰岛素水平及卵巢颗粒细胞中PTEN mRNA的表达,并进行相关性分析,探讨PTEN影响和促进PCOS发生发展的具体信号通路,进一步揭示PCOS的分子生物学发病机制,为临床实现PCOS精准治疗提供理论支持。

1 资料与方法

1.1 研究对象 本研究获得福建省泉州市妇幼保健院伦理委员会批准(2018年伦理:第拾号),所有研究对象均签署知情同意书,自愿捐赠辅助生殖治疗中的废弃颗粒细胞和FF。严格按照PCOS组和非PCOS组的纳入排除标准,选取2020年7月—2021年12月在福建省泉州市妇幼保健院生殖中心实施[IVF-ET或卵细胞浆内单精子注射(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)]治疗的不孕患者共70例,其中PCOS组35例,对照组35例。

所有研究对象3个月内无激素类药物应用史,PCOS患者纳入标准参考2003年鹿特丹诊断标准^[8](3项中符合2项):①稀发排卵或无排卵(anovulatory, AO);②HA或高雄激素的临床表现(多毛和痤疮等);③超声检查双侧卵巢均有>12个直径2~9 μm的小卵泡和(或)卵巢体积增大(每侧>10 mL);④除外HA的其他原因。排除标准:除PCOS外其他引起排卵障碍的内分泌疾病(先天性肾上腺增生、库欣综合征、分泌雄激素的肿瘤、高催乳素血症和甲状腺疾病等)。同时选取行IVF-ET/ICSI治疗的因男方因素或输卵管因素不孕患者作为对照,对照组患者均月经正常、基础激素水平[卵泡刺激素(follicle stimulating hormone, FSH)<10 IU·L⁻¹,黄体生成激素(luteinizing hormone, LH)<10 IU·L⁻¹和雌二醇(estradiol, E2)<50 ng·L⁻¹]正常、无临床或生化指标提示HA表现。

1.2 主要试剂和仪器 实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR)的PTEN和β-actin引物均由大连TaKaRa公司合成,睾酮(testosterone, T)、E2、孕激素(progesterone, P)和胰岛素电化学发光法试剂盒购自美国雅培医药公司,重组人促卵泡激素α(recombinant human follicle stimulating hormone alpha, r-hFSHα)注射液(商品名:果纳芬,75 U/支)购自法国默克雪兰诺公司,注射用尿促性素(human menopausal gonadotropin, HMG, 75 U/支)和注射用人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, HCG, 2000 U/支)购自珠海丽珠集团丽珠制药厂,微量RNA提取试剂盒和逆转录试剂盒(货号:06 366 821 001, 04 896 866 001)购自瑞士罗氏公司,SYBR Green I RT-qPCR试剂盒(货号:DRR041A)购自大连TaKaRa公司;其余试剂均购自美国Sigma公司。超微量紫外可见分光光度计(型号:ND-100,杭州米欧仪器有限公司),StepOnePlus™实时PCR扩增仪(型号:7500 Fast,美国ABI公司)。

1.3 黄体中期控制性超促排卵(controlled ovarian hyperstimulation, COH)方案 采用COH方案促性腺激素释放激素激动剂1.0~1.3 mg皮下注射,10~14 d达降调节标准(阴道超声监测卵泡直径≤10 mm、子宫内膜≤5 mm、FSH<5 U·L⁻¹, LH<2 U·L⁻¹和E2<50 ng·L⁻¹)后,于月经第3~5天给予r-hFSHα行控制性超促排卵(controlled ovarian hyperstimulation, COH)方案,根据患者年龄、卵

巢基础窦卵泡计数 (antral follicle counting, AFC) 和既往卵巢反应性等情况确定起始用量, 一般为150~300 U, 根据阴道超声监测卵泡生长情况适时减少r-hFSH α 用量, 并增加HMG用量, 直径 \geq 16 mm卵泡数占直径 \geq 14 mm卵泡数的60%以上时考虑卵泡接近成熟, 当晚肌注HCG 5 000~10 000 U, 于注射HCG 34~36 h后在阴道超声引导下进行卵泡穿刺取卵。

1.4 FF和颗粒细胞标本收集 卵巢颗粒细胞的分离按课题组前期研究^[9]的操作步骤进行: 采卵当日, 上午9:00—11:00点收集直径 $>$ 14 mm的清亮、无血液及缓冲液污染的FF, 立即对其行1 000 r·min⁻¹离心15 min, 取上清液-70℃保存待测。同时收取FF同源的卵巢颗粒细胞, 淋巴细胞分离液和红细胞裂解液除去红细胞, 洗涤、沉淀后的颗粒细胞保存于冷冻保存管, 液氮中保存待测。

1.5 电化学发光法检测FF中性激素和胰岛素水平

取出冻存的FF标本, 室温解冻, 恒温后静置1 h, 试剂盒室温平衡1 h, 操作步骤严格按照说明书进行, 采用电化学发光法检测FF中T、E2、P和胰岛素水平。所有标本同批检测, 批内变异系数 $<$ 5%, 批间变异系数 $<$ 10%, 各项质控均符合要求。

1.6 RT-qPCR法检测颗粒细胞中PTEN mRNA表达水平

取出冻存的卵巢颗粒细胞标本, 按微量RNA提取试剂盒和逆转录试剂盒说明书提取RNA并合成cDNA; 利用ABI 7500 PCR扩增仪, 按SYBR Green I RT-qPCR试剂盒说明书进行扩增, 具体实验步骤参照课题组前期研究^[9]的操作步骤进行, PCR法反应以标准两步法进行。反应条件: 95℃、30 s; 95℃、5 s, 60℃、34 s, 40个循环; 95℃、15 s, 60℃、1 min, 95℃、15 s (熔解曲线分析阶段)。PCR反应结束后采用荧光定量分析软件, 计算出各待测样品的相对初始拷贝数; 引物由大连TaKaRa公司合成: PTEN上游引物, 5'-AC-ACCGCCAAATTTAATTGCAG-3', 下游引物,

5'-TGTCATCTTCACTTAGCCATTGGTC-3'; β -actin上游引物, 5'-TGGCACCCAGCACAAATG-AA-3', 下游引物, 5'-CTAAGTCATAGTCCGC-CTAGAAGCA-3'。采用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法计算目的基因表达水平。

1.7 统计学分析 采用SPSS 26.0软件进行统计学分析。2组患者的年龄、AFC、基础FSH和促性腺激素 (gonadotropins, Gn) 总量服从正态分布, 以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 2组间样本均数比较采用两独立样本t检验; 2组患者的不孕年限、体质量指数 (body mass index, BMI)、Gn使用天数、基础E2、基础P、基础泌乳素 (prolactin, PRL)、基础T、抗缪勒管激素 (anti-Müllerian hormone, AMH)、FF中性激素和胰岛素水平及PTEN mRNA表达水平不服从正态分布, 以中位数 (四分位数) [M (P25, P75)] 表示, 2组间比较采用Mann-Whitney U检验。采用Spearman相关性分析法分析2组患者卵巢颗粒细胞中PTEN mRNA表达水平和FF中T水平与FF中胰岛素水平的相关性。以P $<$ 0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2组患者一般情况 共收集到35例PCOS因素不孕病例 (PCOS组) 和35例非PCOS因素不孕病例 (对照组), 2组患者年龄、不孕年限、BMI、基础FSH、基础E2、基础P、基础PRL、Gn总量和Gn使用天数比较差异均无统计学意义 (P $>$ 0.05); PCOS组患者基础LH (P $<$ 0.001)、基础T (P=0.037)、AMH (P $<$ 0.001) 和AFC (P $<$ 0.001) 明显高于对照组。见表1和2。

2.2 2组患者颗粒细胞中PTEN mRNA表达水平 PCOS组患者卵巢颗粒细胞中PTEN mRNA表达水平 [0.26 (0.11, 0.79)] 高于对照组 [0.11 (0.04, 0.17)], 差异有统计学意义 (Z=4.011, P $<$ 0.001)。

2.3 2组患者FF中性激素和胰岛素水平 PCOS组

表1 2组患者一般临床资料

Tab.1 General clinical data of patients in two groups

(n=35)

Group	Age(year)	Infertility period(year)	BMI(kg·m ⁻²)	AFC	Gn dosage	Days of Gn administration(t/d)
Control	29.37 \pm 3.52	2.00(2.00, 4.00)	21.90(20.20, 24.80)	13.03 \pm 2.63	23.79 \pm 4.59	10.00(9.00, 10.00)
PCOS	29.00 \pm 3.63	2.00(2.00, 5.00)	23.10(20.90, 25.80)	21.83 \pm 4.60	21.47 \pm 5.62	9.00(8.00, 10.00)
t/Z	0.735	0.211	1.181	9.818	-1.887	-1.568
P	0.465	0.833	0.238	$<$ 0.001	0.063	0.117

表2 2组患者基础激素水平

Tab.2 Levels of basic hormones of patients in two groups

(n=35)

Group	Basal FSH [$\lambda_B/(IU \cdot L^{-1})$]	Basal LH [$\lambda_B/(IU \cdot L^{-1})$]	Basal E2 [$\rho_B/(ng \cdot L^{-1})$]	Basal PRL [$\rho_B/(\mu g \cdot L^{-1})$]	Basal P [$\rho_B/(\mu g \cdot L^{-1})$]	Basal T [$\rho_B/(\mu g \cdot L^{-1})$]	AMH [$\rho_B/(\mu g \cdot L^{-1})$]
Control	5.36±1.20	4.53 (3.82, 5.83)	46.91 (34.02, 60.89)	15.41 (10.55, 19.63)	0.47 (0.24, 0.84)	0.67 (0.30, 1.68)	3.02 (1.99, 4.73)
PCOS	5.56±1.38	8.02 (4.73, 10.56)	49.8 (40.76, 62.23)	18.26 (11.63, 21.94)	0.53 (0.30, 0.89)	1.34 (0.55, 2.82)	7.84 (5.25, 11.01)
t/Z	0.632	3.500	1.263	1.128	0.734	2.085	5.356
P	0.530	<0.001	0.207	0.259	0.463	0.037	<0.001

患者FF中T水平和胰岛素水平均高于对照组 ($P=0.003$, $P=0.002$), 而PCOS组患者FF中E2和P水平均明显低于对照组 ($P<0.001$, $P=0.006$)。PCOS组患者FF中E2/T比值低于对照组 ($P<0.001$)。见表3。

2.4 2组患者颗粒细胞中PTEN mRNA表达水平与FF中胰岛素水平相关性 PCOS组患者颗粒细胞中PTEN mRNA表达水平与FF中胰岛素水平呈

正相关关系 ($r=0.616$, $P<0.001$); 而对照组患者颗粒细胞中PTEN mRNA表达水平与FF中胰岛素水平无相关性 ($r=-0.214$, $P=0.216$)。见图1。

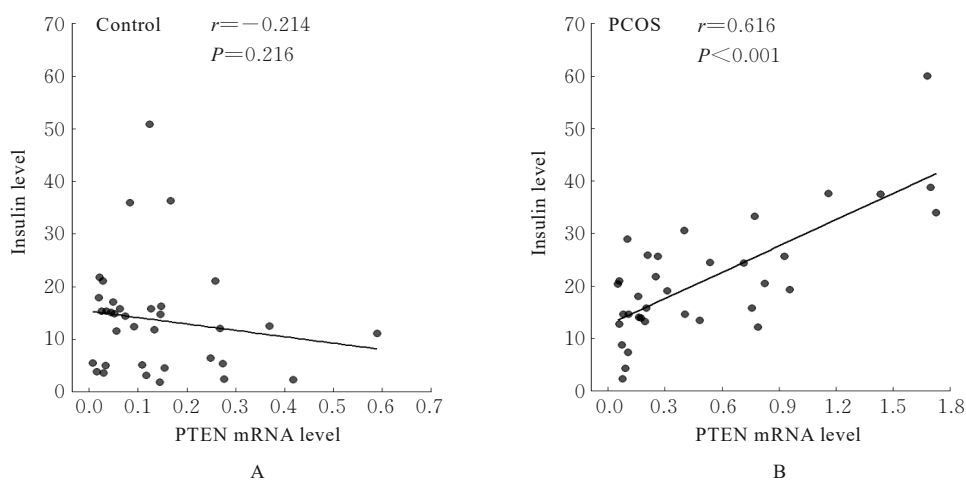
2.5 2组患者FF中T水平与胰岛素水平的相关性 PCOS组患者FF中T水平与胰岛素水平呈正相关关系 ($r=0.577$, $P<0.001$); 而对照组患者FF中T水平与胰岛素水平无相关性 ($r=0.266$, $P=$

表3 IVF助孕周期2组患者FF中性激素和胰岛素水平

Tab.3 Level of sex hormones and insulin in FF of patients in two groups

(n=35)

Group	T [$\rho_B/(\mu g \cdot L^{-1})$]	E2 [$\rho_B/(ng \cdot L^{-1})$]	P [$\rho_B/(\mu g \cdot L^{-1})$]	E2/T ratio	Insulin [$\lambda_B/(mU \cdot L^{-1})$]
Control	3.96 (3.16, 4.27)	32 552.00 (25 788.00, 39 029.00)	25 656.00 (22 277.00, 31 321.00)	8.24 (6.23, 12.32)	12.40 (5.02, 16.20)
PCOS	4.87 (3.63, 5.98)	23 069.00 (19 764.00, 28 453.00)	21 421.00 (18 921.00, 26 272.00)	4.71 (3.60, 7.50)	19.30 (13.80, 25.80)
Z	2.972	-3.694	-2.731	-4.234	3.089
P	0.003	<0.001	0.006	<0.001	0.002



A: Control group; B: PCOS group.

图1 颗粒细胞中PTEN mRNA表达水平与FF中胰岛素水平相关性分析

Fig. 1 Correlation analysis of PTEN mRNA levels in granulosa cells and insulin levels in FF

0.123)。见图2。

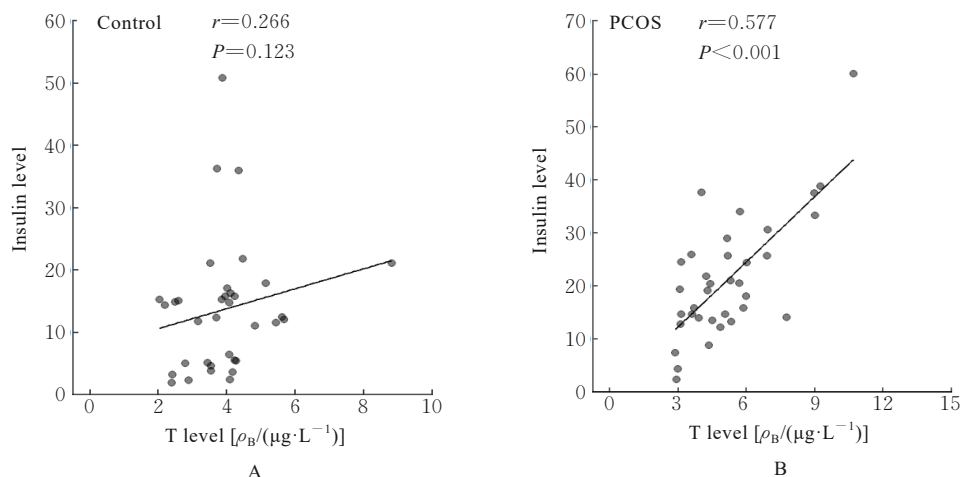
3 讨论

PCOS因其病因不清、异质性的临床表现,使得治疗方法复杂,是目前妇科内分泌领域研究的热点和难点问题^[10]。PCOS作为一种生殖功能障碍、内分泌异常和代谢异常并存的特殊综合征,常表现出卵巢多囊化(polycystic ovary, PCO)、AO和HA等典型临床症状,50%~70%的PCOS患者存在IR^[11]。IR是卵巢排卵障碍和糖代谢紊乱的共同分子机制,胰岛素影响性激素和卵泡发育过程可能是通过其对颗粒细胞的增殖分化从而发挥调控作用^[12-13]。卵巢局部生殖内分泌传导通路异常严重影响卵巢性激素合成和分泌,其中胰岛素信号发挥着关键作用。但IR或高胰岛素血症如何诱导并促进PCOS的发生发展目前尚未完全阐释。PCOS被认为可能是一种原发性卵泡病,其可能与IR有关^[14]。抑癌基因PTEN负向影响PI3K信号通路,是调控生殖功能的重要信号分子,能调节胰岛素和甾体激素的代谢通路,在IR或卵泡发育障碍中起重要的作用^[15]。卵泡的发育是由多个信号通路共同影响,是复杂且漫长的过程。PTEN如何影响和调控PCOS患者的卵泡发育障碍、内分泌紊乱及糖代谢异常尚未得到充分阐释。本研究收集PCOS不孕患者的卵巢颗粒细胞和FF,采用RT-qPCR法检测2组患者卵巢颗粒细胞中PTEN mRNA水平,通过电化学发光法检测FF中胰岛素、雌激素、雄激素和P水平,初步探讨PTEN表达在PCOS发生发展中的可

能机制。

抑制癌症的基因是能够抑制潜在细胞恶变的一类基因,主要发挥调节细胞增殖和分化的作用。PTEN是抑癌基因家族中首个具有磷酸酶活性的基因,在细胞增殖分化和信号传递等方面发挥重要作用,是影响和调节卵泡正常发育的关键基因^[5]。既往研究^[4, 16]显示:许多肿瘤的发生发展与PTEN调节作用存在密切关联,但目前PTEN对人卵泡发育的作用仍未被完全阐释^[5, 15]。对抑癌基因PTEN的研究有助于深入探讨正常卵巢生理功能和相关卵巢疾病的分子机制。本课题组前期研究^[9, 17]证实了PTEN基因在人卵巢颗粒细胞中的表达,IVF-ET助孕周期超促排卵过程中,卵巢低反应者颗粒细胞中PTEN mRNA表达水平明显高于卵巢高反应者,PTEN mRNA表达水平与卵泡各发育指标呈负相关关系,对卵母细胞的质量及其胚胎的发育潜能是不利的,提示抑癌基因PTEN可能负向影响卵泡发育过程。PCOS患者的生殖特征常表现为卵泡发育障碍和稀发排卵或AO,故PCOS模型可作为研究卵泡发育过程的实验对象。本研究采用RT-qPCR法检测2组患者颗粒细胞中PTEN mRNA表达,结果显示:PCOS组患者颗粒细胞中PTEN mRNA表达水平明显高于对照组。PTEN在以卵泡发育障碍过程为特征的PCOS不孕患者中表达增强,提示PTEN可能调节人颗粒细胞的增殖分化过程,进而影响卵泡发育成熟及性激素合成,但其确切的分子机制还有待进一步阐释。

Gn及许多生长因子的综合作用与卵泡周期性



A: Control group; B: PCOS group.

图2 2组患者FF中T水平与胰岛素水平相关性分析

Fig. 2 Correlation analysis of T levels and insulin levels in FF of patients in two groups

的生长发育存在密切关联, 卵泡发育障碍也常伴随性激素合成和分泌异常。胰岛素在卵泡的发育和成熟过程中也发挥重要作用, 是重要的卵巢调节因子^[18]。研究^[19]表明: 不同的胰岛素水平发挥不同的卵泡调控作用, 中等浓度胰岛素促进原始卵泡发育, 反之高浓度胰岛素则抑制卵泡生长。动物实验研究^[20]发现: 高胰岛素血症组患者卵巢发生PCOS改变。高胰岛素血症负向影响卵巢内颗粒细胞功能进而导致卵泡发育及成熟障碍^[3]。IR和HA是PCOS发病的重要病理机制, HA可刺激卵巢雄激素的产生, IR和高雄激素抑制了性激素结合球蛋白(sex hormone-binding globulin, SHBG)合成而使游离雄激素水平升高, 进一步加剧HA的发展, 但迄今为止, 高胰岛素与高雄激素协同作用共同促进PCOS发生发展的具体分子机制尚未阐明^[21]。本研究采用电化学发光法检测2组患者FF中T、E₂、P及胰岛素水平差异性, 结果显示: PCOS不孕患者不能有效地将雄激素转化为雌激素, 卵泡局部雄激素水平过高, 雌激素水平过低, 导致卵泡不能正常发育, 卵泡局部高雄激素可能是影响卵巢功能障碍的更直接因素; 本研究同时检测到PCOS组患者FF中胰岛素水平明显高于对照组, 此结果与既往研究^[22]结果一致。相关性分析结果提示: FF中胰岛素水平升高可能通过影响卵泡雄激素水平进而在PCOS发病中发挥作用, 但高胰岛素和高雄激素之间的相互作用及因果关系仍需后续研究得以进一步阐明。

研究^[23]显示: PTEN可促进胰岛素摄取葡萄糖, 成年小鼠PTEN缺失可提高胰岛素敏感, 并伴有低血糖水平。抑癌基因PTEN高表达在某种程度上促进IR发生^[7]。胰岛素发挥其正常生理作用的主要通路包括PI3K/Akt信号通路^[24], 而在PI3K/Akt信号通路中, PTEN是非常有效的负性调节因子之一。在IR状态, 胰岛素刺激引起的PI3K/Akt信号通路途径的作用下降^[7]。研究^[25]显示: 50%~70%的PCOS患者存在IR, 且PCOS患者的IR是选择性的IR, 存在IR的某些组织中, 胰岛素敏感性下降, 反之则胰岛素敏感性升高。相关性研究结果提示: PCOS患者出现IR可能通过颗粒细胞中PTEN发挥作用, 但确切的分子信号通路有待后续实验深入探讨。

综上所述, PCOS组患者颗粒细胞中PTEN mRNA存在较高表达, PCOS组患者FF中T水平

和胰岛素水平明显升高; PCOS组患者中, 随着卵巢颗粒细胞中抑癌基因PTEN mRNA表达水平升高, FF中胰岛素水平也随之上升, 且后者与T水平呈正相关关系, 提示FF中高胰岛素水平与高雄激素存在密切关联, PCOS患者普遍存在IR, 卵泡高胰岛素水平可能通过PTEN-PI3K/Akt信号通路介导, 从而导致PCOS卵泡发育障碍。但本研究局限于借助IVF-ET助孕的PCOS患者, 而PCOS患者卵巢内各阶段FF中激素水平的变化是复杂的, PTEN-PI3K/Akt信号通路及FF中T水平和胰岛素水平之间如何协同作用进而影响卵泡正常发育还需深入探讨。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

姚建凤和黄荣富参与选题及论文撰写, 吴培雅和陈丽影参与论文选题、临床数据及实验标本收集, 王燕婷和凌幼霞参与实验操作过程, 陈晓燕、陈婉真和陶萍参与数据的统计学分析, 李友筑参与论文撰写和论文修改。

[参考文献]

- [1] ARMANINI D, BOSCARO M, BORDIN L, et al. Controversies in the pathogenesis, diagnosis and treatment of PCOS: focus on insulin resistance, inflammation, and hyperandrogenism[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(8): 4110.
- [2] HERMAN R, SIKONJA J, JENSTERLE M, et al. Insulin metabolism in polycystic ovary syndrome: secretion, signaling, and clearance[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(4): 3140.
- [3] WANG K X, LI Y H. Signaling pathways and targeted therapeutic strategies for polycystic ovary syndrome[J]. *Front Endocrinol*, 2023, 14: 1191759.
- [4] LEE Y R, CHEN M, PANDOLFI P P. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor: new modes and prospects[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(9): 547-562.
- [5] HU C F, ZHAO X Y, CUI C, et al. miRNA-29-3p targets PTEN to regulate follicular development through the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Theriogenology*, 2024, 214: 173-181.
- [6] RAMASUBBU K, DEVI RAJESWARI V. Impairment of insulin signaling pathway PI3K/Akt/mTOR and insulin resistance induced AGEs on diabetes mellitus and neurodegenerative diseases: a perspective

- review[J]. *Mol Cell Biochem*, 2023, 478(6):1307-1324.
- [7] LI Y Z, DI CRISTOFANO A, WOO M. Metabolic role of PTEN in insulin signaling and resistance[J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2020, 10(8): a036137.
- [8] ROTTERDAM ESHRE/ASRM-SPONSORED PCOS CONSENSUS WORKSHOP GROUP. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS)[J]. *Hum Reprod*, 2004, 19(1): 41-47.
- [9] YAO J F, HUANG R F, LI M, et al. PTEN expression in human granulosa cells is associated with ovarian responses and clinical outcomes in IVF [J]. *Reprod Sci*, 2021, 28(7): 1910-1921.
- [10] MYERS S H, RUSSO M, DINICOLA S, et al. Questioning PCOS phenotypes for reclassification and tailored therapy[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2023, 34(11):694-703.
- [11] WANG J, WU D C, GUO H, et al. Hyperandrogenemia and insulin resistance: the chief culprit of polycystic ovary syndrome[J]. *Life Sci*, 2019, 236: 116940.
- [12] ZHANG S, TU H Y, ZHU J M, et al. Dendrobium Nobile Lindl. polysaccharides improve follicular development in PCOS rats [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 149: 826-834.
- [13] XU Y L, QIAO J. Association of insulin resistance and elevated androgen levels with polycystic ovarian syndrome (PCOS): a review of literature[J]. *J Health Eng*, 2022, 2022: 9240569.
- [14] 吴效科. 多囊卵巢综合征可能是原发性卵泡病[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2007, 23(9): 660-663.
- [15] ZHU Q L, YAO Y, XU L Z, et al. Elevated SAA1 promotes the development of insulin resistance in ovarian granulosa cells in polycystic ovary syndrome[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2022, 20(1): 4.
- [16] CHAI C S, WU H H, ABUETABH Y, et al. Regulation of the tumor suppressor PTEN in triple-negative breast cancer [J]. *Cancer Lett*, 2022, 527: 41-48.
- [17] YAO J F, LI M, LIN L Q, et al. PTEN expression in human cumulus cells is associated with embryo development competence[J]. *Zygote*, 2022, 30(5): 611-618.
- [18] MACUT D, BJEKIĆ-MACUT J, RAHELIC D, et al. Insulin and the polycystic ovary syndrome [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2017, 130: 163-170.
- [19] YU N, ROY S K. Development of primordial and prenatal follicles from undifferentiated somatic cells and oocytes in the hamster prenatal ovary *in vitro*: effect of insulin[J]. *Biol Reprod*, 1999, 61(6): 1558-1567.
- [20] 靳 镭, 聂 睿. 高胰岛素血症与多囊卵巢综合征大鼠排卵障碍的相关性研究[J]. *生殖医学杂志*, 2008, 17(4): 276-280.
- [21] GOODARZI M O, DUMESIC D A, CHAZENBALK G, et al. Polycystic ovary syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2011, 7(4): 219-231.
- [22] LI A D, ZHANG L, JIANG J J, et al. Follicular hyperandrogenism and insulin resistance in polycystic ovary syndrome patients with normal circulating testosterone levels[J]. *J Biomed Res*, 2017, 32(3): 208-214.
- [23] CRESPO-MASIP M, PÉREZ-GÓMEZ A, GUZMÁN C, et al. PTEN deletion in adult mice induces hypoinsulinemia with concomitant low glucose levels[J]. *Front Endocrinol*, 2022, 13: 850214.
- [24] HUANG X J, LIU G H, GUO J, et al. The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes [J]. *Int J Biol Sci*, 2018, 14(11): 1483-1496.
- [25] MOGHETTI P, TOSI F. Insulin resistance and PCOS: chicken or egg? [J]. *J Endocrinol Invest*, 2021, 44(2): 233-244.