

[文章编号] 1671-587X(2025)05-1177-08

DOI:10.13481/j.1671-587X.20250503

胎盘表达转录因子1在多囊卵巢综合征大鼠卵巢组织中的表达及其对大鼠卵巢颗粒细胞增殖的影响

付璐璐¹, 邹颖刚¹, 郑晓宇², 张雪莹¹, 张京顺¹, 王敏¹, 张婧¹, 郑连文¹

(1. 吉林大学第二医院生殖中心, 吉林 长春 130022; 2. 东莞松山湖东华医院妇科, 广东 东莞 523000)

[摘要] **目的:** 探讨胎盘表达转录因子1 (Plet1) 在来曲唑构建的多囊卵巢综合征 (PCOS) 模型大鼠卵巢组织中的表达及其对大鼠卵巢颗粒细胞增殖调控作用, 并阐明 Plet1 参与 PCOS 发病的可能机制。**方法:** 取课题组前期研究采集的大鼠卵巢样本, 分为对照组和 PCOS 组, 采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 和 Western blotting 法检测 2 组大鼠卵巢组织中 *Plet1* mRNA 和蛋白表达水平。另取 24 只大鼠, 采用阴道涂片鉴定将大鼠分为发情前期、发情期、发情后期及发情间期 4 组, RT-qPCR 法检测不同发情周期大鼠卵巢组织中 *Plet1* mRNA 表达水平, 免疫组织化学法检测大鼠卵巢组织中 Plet1 表达定位。转染大鼠卵巢颗粒细胞, 分为对照组、si-Plet1-rat-266 组、si-Plet1-rat-383 组和 si-Plet1-rat-554 组。采用细胞计数试剂盒 8 (CCK-8) 法检测各组大鼠卵巢颗粒细胞增殖活性, 采用 RT-qPCR 法检测各组大鼠卵巢颗粒细胞中细胞分裂蛋白激酶 6 (CDK6) 和 *P53* mRNA 表达水平。**结果:** RT-qPCR 法检测, *Plet1* mRNA 在正常大鼠卵巢中表达, *Plet1* mRNA 表达水平在各发情周期组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。免疫组织化学检测, Plet1 蛋白在大鼠卵巢组织中表达定位主要在卵巢颗粒细胞和黄体细胞。与对照组比较, PCOS 组大鼠卵巢中 *Plet1* mRNA 和蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.05$)。RT-qPCR 法检测, 与对照组比较, si-Plet1-rat-383 组大鼠卵巢颗粒细胞中 *Plet1* mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.01$), 且下降幅度最大。CCK-8 法检测, 与对照组比较, si-Plet1-rat-383 组大鼠卵巢颗粒细胞增殖活性明显降低 ($P < 0.05$)。与对照组比较, si-Plet1-rat-383 组 *CDK6* 和 *P53* mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论:** Plet1 蛋白在正常大鼠卵巢组织中表达分布主要集中于卵巢颗粒细胞和黄体细胞。PCOS 模型大鼠卵巢组织内 *Plet1* 基因表达下调, 干扰 *Plet1* 基因表达可抑制大鼠卵巢颗粒细胞增殖。

[关键词] 多囊卵巢综合征; 胎盘表达转录因子1; 发情周期; 卵巢颗粒细胞; 细胞增殖

[中图分类号] R711.7 **[文献标志码]** A

Expression of placenta expressed transcription factor 1 in ovarian tissue of polycystic ovary syndrome rats and its effect on proliferation of rat ovarian granulosa cells

FU Lulu¹, ZOU Yinggang¹, ZHENG Xiaoyu², ZHANG Xueying¹, ZHANG Jingshun¹, WANG Min¹,
ZHANG Qiang¹, ZHENG Lianwen¹

(1. Reproductive Center, Second Hospital, Jilin University, Changchun 130022, China; 2. Department of Gynecology, Dongguan Songshan Lake Tungwah Hospital, Dongguan 523000, China)

[收稿日期] 2024-10-15 [录用日期] 2024-12-18

[基金项目] 吉林省科技厅科技发展计划项目 (20210101462JC)

[作者简介] 付璐璐 (1988—), 女, 山东省聊城市人, 主治医师, 医学博士, 主要从事生殖内分泌方面的研究。

[通信作者] 郑连文, 教授, 博士研究生导师 (E-mail: zhenglw@jlu.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.

ABSTRACT Objective: To investigate the expression of placenta expressed transcript 1 (Plet1) in ovarian tissue of the letrozole-induced model rats of polycystic ovary syndrome (PCOS) and its effect on the proliferation of rat ovarian granulosa cells, and to clarify the possible mechanism by which Plet1 may contribute to the pathogenesis of PCOS. **Methods:** The ovarian tissue samples from the rats collected in previous studies were used and divided into control and PCOS groups. Real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blotting methods were used to detect the expression levels of *Plet1* mRNA and protein in ovarian tissue of the rat in two groups. Additionally, twenty-four rats underwent vaginal smear cytology were divided into four groups by estrous cycle phase: proestrus, estrus, metestrus and diestrus. RT-qPCR was used to detect the expression level of *Plet1* mRNA in ovarian tissue of the rats in various groups, and immunohistochemistry (IHC) method was used to detect the location of Plet1 expression in the rat ovarian tissue in various groups. The rat ovarian granulosa cells were transfected and divided into control group, si-Plet1-rat-266 group, si-Plet1-rat-383 group, and si-Plet1-rat-554 group. Cell counting kit-8 (CCK-8) method was used to assess the cell proliferation activities of rat ovarian granulosa cells in various groups, and RT-qPCR method was used to detect the expression levels of cyclin-dependent kinase 6 (*CDK6*) and *P53* mRNA in rat ovarian granulosa cells in various groups. **Results:** The RT-qPCR results revealed that *Plet1* mRNA was expressed in the ovaries of normal rats, while no statistically significant difference was observed across estrous cycle phases ($P > 0.05$). The immunohistochemistry results showed that the expression of Plet1 protein was mainly localized in ovarian granulosa cells and luteal cells in the rat ovarian tissue. Compared with control group, the expression levels of *Plet1* mRNA and protein in ovarian tissue of the rats in PCOS group were significantly decreased ($P < 0.05$). The RT-qPCR results showed that compared with control group, the expression level of *Plet1* mRNA in ovarian granulosa cells in si-Plet1-rat-383 group was decreased ($P < 0.01$), exhibiting the most pronounced reduction. Compared with control group, the proliferation activity of rat ovarian granulosa cells in si-Plet1-rat-383 group was decreased ($P < 0.05$). Compared with control group, the expression levels of *CDK6* and *P53* mRNA in rat ovarian granulosa cells in si-Plet1-rat-383 group were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** Plet1 protein is predominantly expressed and localized in granulosa cells and luteal cells in normal rat ovarian tissue. Its expression is downregulated in the ovarian tissue of PCOS model rats, and interference with *Plet1* gene expression may inhibit the proliferation of rat ovarian granulosa cells.

KEYWORDS Polycystic ovary syndrome; Placenta expressed transcription factor 1; Estrous cycle; Ovarian granulosa cells; Cell proliferation

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 作为育龄女性群体中普遍存在的内分泌与代谢异常综合征, 其特点涵盖了高雄激素状态、卵巢多囊性改变、持续的排卵功能障碍以及代谢失调。PCOS 患者常面临排卵紊乱的困扰, 这一现象更是育龄女性因排卵障碍所致不孕症的重要诱因之一, 影响着女性的生殖健康。研究^[1-4]显示: PCOS 患者面临不良妊娠结局的风险呈现上升趋势, 然而其内在机制仍待阐明。胎盘表达转录因子 1 (placenta expressed transcription factor 1, Plet1) 在牛、猪、羊和小鼠等多种生物体内均有表达分布^[5-8]。已有研究^[9-11]显示: Plet1 在细胞分化、迁移和黏附过程中扮演关键角色。研究^[6, 12]显示: Plet1 可能在胎盘中参与调控母胎联系和胚胎质量

的相关过程。本课题组前期研究^[13]通过高通量测序技术发现 PCOS 模型大鼠卵巢组织中 *Plet1* 表达水平低于正常对照组。本研究采用实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 法、Western blotting 法和免疫组织化学染色等方法探讨正常大鼠卵巢组织中 Plet1 表达水平与位置分布, 并同步分析来曲唑所构建的 PCOS 模型鼠卵巢组织中 Plet1 的表达情况及其对大鼠卵巢颗粒细胞增殖功能的影响, 以阐明 Plet1 在 PCOS 发病中的潜在作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要试剂和仪器 24 只 80 日龄健康雌性 SD 大鼠由吉林大学实验动物中心提供, 体

质量约200 g, 动物使用许可证号: SYXK(吉)2016-0001。本研究经吉林大学第二医院伦理委员会审批(伦理审批号: KT202009087)。Plet1多克隆抗体购自武汉博欧特生物科技有限公司, TRIzol试剂购自上海拜力生物科技有限公司, 逆转录试剂盒购自北京启维益成科技有限公司, RT-qPCR SYBR试剂盒购自北京宝日医生物技术有限公司, 免疫组织化学试剂盒购自武汉博士德生物公司, 一抗稀释液、二抗稀释液、二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白浓度测定试剂盒(增强型)和细胞计数试剂盒8(cell counting kit-8, CCK-8)试剂购自上海碧云天生物技术公司。荧光显微镜(型号: IX71)购自日本Olympus公司, 电泳图像分析系统(型号: FR-980B)购自上海玉博生物科技有限公司, RT-qPCR仪(型号: FQD-96A)购自北京科誉兴业科技发展有限公司, 全自动化学发光测定仪(型号: IS 1200)购自四川迈克生物科技股份有限公司。

1.2 实验动物分组和样本采集 对照组和PCOS组大鼠卵巢组织来自本课题组前期工作, 实验应用来曲唑灌胃造模并留取组织标本^[13]。将24只雌性SD大鼠分为4组, 通过阴道涂片鉴定为发情前期、发情期、发情后期和发情间期, 每组6只。使用2%戊巴比妥钠对大鼠实施麻醉致死, 双侧卵巢被摘除。选取其中一侧卵巢, 采用10%甲醛溶液加以固定处理; 相对应的另一侧保存于-80℃环境中。

1.3 免疫组织化学染色法检测Plet1在大鼠卵巢组织中表达定位 对正常大鼠卵巢组织切片样本进行免疫组织化学染色。切片脱蜡并充分水化后, 滴加3% H₂O₂于室温孵育, 随后置于10 mmol·L⁻¹ pH为6.0枸橼酸缓冲液中, 微波98℃高温加热10 min, 解冻20 min, 静置至室温。使用10%山羊血清进行封闭, 37℃孵育30 min。加入稀释比例为1:200的兔抗Plet1多克隆抗体, 于4℃过夜孵育。对样本进行轻度苏木精复染2 min, 随后于盐酸乙醇中短暂分化, 置于饱和碳酸锂中显蓝30 s, 于显微镜下观察, 可见细胞核呈现蓝色。采用乙醇梯度脱水与透明处理后, 使用中性树胶封固玻片。显微镜下拍照记录, 观察染色结果。

1.4 RT-qPCR法检测大鼠卵巢组织中Plet1 mRNA表达水平 采用TRIzol提取卵巢组织总RNA, 用逆转录试剂盒将RNA逆转录为cDNA, 逆转录体系10 μL, 包括5×All-In-One RT Mastermix 4 μL,

Nuclease-free H₂O 6 μL。充分混匀后置于PCR仪。反应条件为: 25℃、10 min; 42℃、15 min; 85℃、5 min, 1个循环。采用SYBR Mix反应体系进行RT-qPCR反应, 反应体系(20.0 μL): SYBR Mix 10.0 μL, 上游引物0.5 μL, 下游引物0.5 μL, RNase-Free H₂O 7.0 μL, cDNA模板2.0 μL。反应条件: 95℃、5 min预变性; 95℃、10 s变性; 60℃、30 s退火、延伸。记录样本的循环反应阈值并校正, 采用2^{-ΔΔCt}法计算各组大鼠卵巢组织中Plet1 mRNA表达水平。基于美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)数据库所提供的基因序列信息, 采用Allele ID6软件设计RT-qPCR所需引物。设计的引物由吉林省库美生物科技有限公司负责合成。见表1。

表1 RT-qPCR引物序列
Tab.1 Primer sequences of RT-qPCR

Primer	Sequence(5'-3')
Plet1	F:AGCGGAGCATACGAGAAGTG R:TGTAGCTGTGCGGTTGATGA
GAPDH	F:CAAGTTCAACGGCACA R:CAGTAGACTCCACGACAT

1.5 Western blotting法检测PCOS组和对照组大鼠卵巢组织中Plet1蛋白表达水平 在卵巢组织中提取蛋白质, 使用牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)测定各样品蛋白浓度。将各组等浓度蛋白样品加载至凝胶上, 电泳分离并鉴定Plet1蛋白的特异性条带。采用半干转法进行转膜, 5%脱脂奶粉进行封闭处理, 使用一抗稀释液分别制备甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)(比例为1:5 000)和Plet1(比例为1:500)一抗溶液。将一抗加入体系中, 于4℃孵育过夜; 用二抗稀释液配制山羊抗鼠二抗(稀释比例为1:3 333), 室温孵育1~2 h。使用辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)-增强型化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)法进行发光及显影。采集图像并使用Image J软件进行分析, 计算目的蛋白表达水平, 实验重复3次。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/GAPDH蛋白条带灰度值。

1.6 RT-qPCR法检测转染后各组大鼠卵巢颗粒细胞中Plet1 mRNA表达水平 将大鼠卵巢颗粒细胞

从CO₂培养环境中取出,转移至生物安全柜内进行无菌操作。吸去原有培养基,用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)清洗2次,每孔加入1.9 mL新鲜完全培养基。用45 μL基础培养基稀释5 μL siRNA溶液,吹打混匀;另用45 μL基础培养基稀释5 μL siRNA非脂质体转染试剂,吹打混匀;将转染试剂与siRNA混合后静置20 min,将混合溶液加入细胞中,每孔100 μL,混匀后37℃孵育48 h。根据转染试剂不同,实验分为对照组、si-Plet1-rat-266组、si-Plet1-rat-383组和si-Plet1-rat-554组。细胞中加入TRIzol试剂,用匀浆器充分迅速研磨,加入三氯甲烷,剧烈摇晃,室温静置10 min,离心15 min,取最上层水相置于新的离心管中。加入等体积的异丙醇,混匀。加入用RNase-free ddH₂O配制的75%乙醇(加入量与TRIzol相同),颠倒清洗沉淀并离心,小心吸取上清并弃掉,室温下晾干。加入100 μL RNase-free ddH₂O充分溶解RNA沉淀,采用超微量紫外可见分光光度计测定各组细胞RNA浓度和质量。依次加入逆转录反应体系组分,充分混匀。总反应体系(20 μL): RNase-free ddH₂O 14 μL, 5×All-in-one qRT SuperMix 4 μL, Enzyme Mix 1 μL, RNA样品1 μL。设置逆转录程序,进行逆转录。依次加入RT-qPCR反应体系组分,充分混匀。设定反应体系,总反应体系(11 μL): 2×ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 5.2 μL, ddH₂O 3.8 μL, 基因上游引物0.5 μL, 基因下游引物0.5 μL, cDNA样品1.0 μL, 进行检测,采用2^{-ΔΔCt}法计算各组卵巢颗粒细胞中Plet1 mRNA表达水平。

1.7 CCK-8法检测转染后2组大鼠卵巢颗粒细胞增殖活性 细胞转染处理24 h后,移除上清液,以PBS缓冲液轻柔清洗培养皿底部,加入适量胰酶消化细胞。离心后去除上清液,保留细胞沉淀,加入完全培养基重悬,接种于96孔细胞培养板。培养24 h后,于各孔加入10 μL CCK-8试剂和90 μL DMEM基础培养基混合溶液,放入CO₂培养箱中孵育60 min。取出96孔细胞培养板,采用酶标仪于450 nm波长处测量各孔吸光度(A)值,以A值代表各组细胞增殖活性。

1.8 RT-qPCR法检测转染后2组大鼠卵巢颗粒细胞中增殖相关基因mRNA表达水平 采用RT-qPCR法检测各组大鼠卵巢颗粒细胞中细胞分裂蛋白激酶6(cyclin-dependent kinase 6, CDK6)和P53 mRNA

的表达水平,检测方法同“1.6”。相应特异性引物序列见表2。

表2 转染后RT-qPCR引物序列

Tab. 2 Primer sequences of RT-qPCR after transfection

Primer	Sequence(5'-3')
CDK6	F:GCACACATCAAACAACCTGACC
	R:GGCCCACTTCACCGTACTAA
P53	F:GCTGACCAGCAGTACGAATG
	R:GCACACATCAAACAACCTGACC
GAPDH	F:CAAGTTCAACGGCACA
	R:CAGTAGACTCCACGACAT

1.9 统计学分析 采用SPSS 17.0统计软件进行统计学分析。通过Shapiro-Wilk检验对各组数据进行正态性检验,大鼠卵巢组织中Plet1 mRNA和蛋白表达水平、转染后各组细胞增殖活性及细胞中Plet1、CDK6和P53 mRNA表达水平均符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,对照组和PCOS组样本均数比较采用两独立样本t检验,多组间样本均数比较采用方差分析,组间样本均数两两比较采用SNK-q检验。以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同发情周期大鼠卵巢组织中Plet1 mRNA表达水平 阴道涂片检查结果显示:依据大鼠雌性发情周期特点,可将其分为4个阶段,包括发情前期,以有核上皮细胞为主;发情期,以角化上皮细胞为主;发情后期,可见有核上皮细胞、角化上皮细胞和白细胞3种细胞存在;发情间期,以白细胞为主。见图1。采用RT-qPCR法对不同发情周期大鼠卵巢组织中Plet1 mRNA表达水平进行检测,结果显示:在4组不同发情周期大鼠卵巢组织中Plet1 mRNA均有表达,其表达水平在各阶段间比较差异无统计学意义(P>0.05)。见图2。

2.2 大鼠卵巢组织中Plet1蛋白表达定位 免疫组织化学染色检测结果显示:在卵巢组织中,Plet1蛋白主要表达于卵丘颗粒细胞、卵泡膜细胞、黄体 and 卵巢间质。Plet1蛋白在卵丘颗粒细胞和黄体中的表达尤为显著,成为这些区域的主要表达蛋白之一。见图3。

2.3 2组大鼠卵巢组织中Plet1 mRNA和蛋白表达水平 RT-qPCR法检测结果显示:与对照组比较,PCOS组大鼠卵巢组织中Plet1 mRNA表达水平明

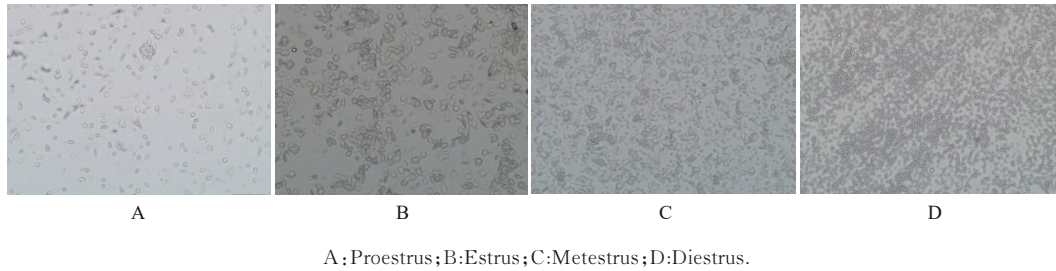
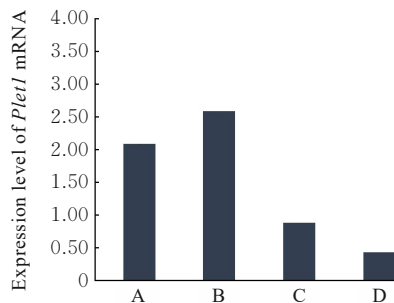


图1 4组大鼠不同发情周期阴道涂片($\times 100$)

Fig. 1 Vaginal smears of rats in four groups at different oestrus stages($\times 100$)



A:Proestrus; B:Estrus; C:Metestrus; D:Diestrus.

图2 4组大鼠不同发情周期卵巢组织中 *Plet1* mRNA 表达水平

Fig. 2 Expression levels of *Plet1* mRNA in ovarian tissue of rats in four groups at different oestrus stages

显降低 ($P < 0.05$)。见图4。Western blotting 法结果显示:与对照组比较,PCOS 组大鼠卵巢组织中 *Plet1* 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。见图5。

2.4 转染后各组大鼠卵巢颗粒细胞中 *Plet1* mRNA 表达水平 转染后各组细胞 RT-qPCR 法检测结果显示:与对照组比较,si-*Plet1*-rat-266 组大鼠卵巢颗粒细胞中 *Plet1* mRNA 表达无明显变化,差异无统计学意义 ($P > 0.05$), si-*Plet1*-rat-383 组和 si-*Plet1*-rat-554 组细胞中 *Plet1* mRNA 表达水平均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见图6。si-*Plet1*-rat-383 组细胞中 *Plet1* mRNA 表达水平最低,敲低

效果最好,因此后续实验选择该组处理方式。

2.5 转染后 2 组大鼠卵巢颗粒细胞增殖活性

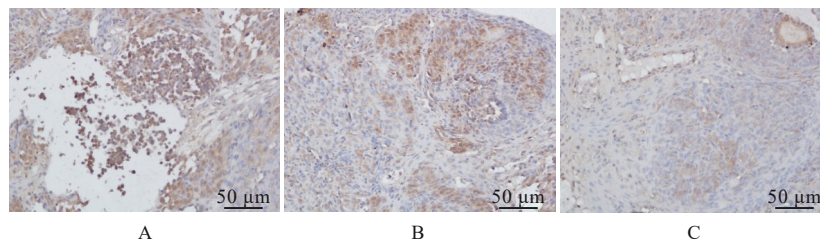
CCK-8 法检测结果显示:与对照组 (1.525 ± 0.231) 比较, si-*Plet1*-rat-383 组 (1.148 ± 0.155) 大鼠卵巢颗粒细胞增殖活性明显降低 ($P < 0.05$)。

2.6 转染后 2 组大鼠卵巢颗粒细胞中增殖相关基因 mRNA 表达水平

RT-qPCR 法结果显示:与对照组比较, si-*Plet1*-rat-383 组大鼠卵巢颗粒细胞中增殖相关基因 *CDK6* 和 *P53* mRNA 表达水平均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表3。

3 讨论

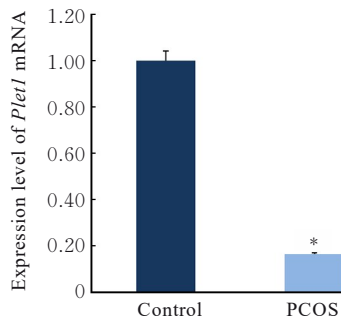
PCOS 是一种常见于育龄女性的内分泌与代谢紊乱性疾病,其主要特征包括排卵障碍、高雄激素血症、胰岛素抵抗和卵巢多囊样改变等,患者常表现出一系列症状,包括月经周期不规律、生育能力下降、体毛增多、皮肤痤疮多发及体质量超标等。PCOS 影响范围广泛,涉及多个系统及器官的功能异常,其病理机制尚未完全明确^[14-18]。深入剖析 PCOS 发生发展中的生殖系统病理演变过程具有重要的临床意义。既往研究^[13] 通过高通量测序技术观察发现:PCOS 模型大鼠卵巢中 *Plet1* 表达水平明显降低,提示 *Plet1* 可能参与 PCOS 的发病机理。本研究采用 RT-qPCR 技术和免疫组织化学等方法,



A: Cumulus granulosa cells; B: Corpus luteum; C: Ovarian stroma.

图3 免疫组织化学染色法检测 *Plet1* 蛋白在大鼠卵巢组织中的表达情况

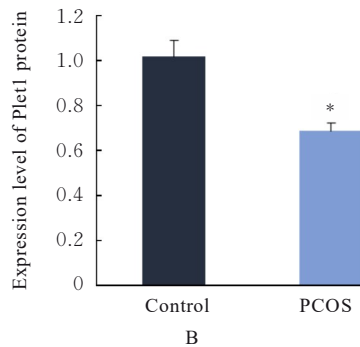
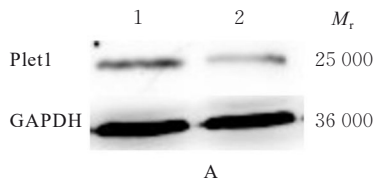
Fig. 3 Expression of *Plet1* protein in ovarian tissue of rats detected by immunohistochemistry staining



* $P < 0.05$ compared with control group.

图4 RT-qPCR法检测2组大鼠卵巢组织中*Plet1* mRNA表达水平

Fig. 4 Expression levels of *Plet1* mRNA in ovarian tissue of rats in two groups detected by RT-qPCR method

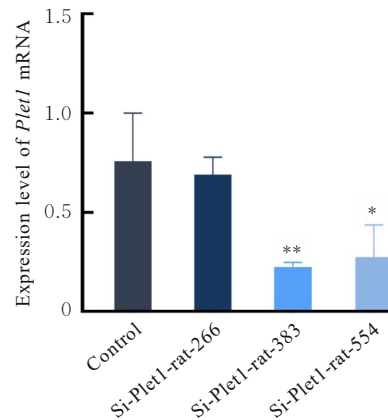


Lane 1: Control group; Lane 2: PCOS group. * $P < 0.05$ compared with control group.

图5 Western blotting法检测2组大鼠卵巢组织中*Plet1*蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 5 Electrophoregram(A) and histogram(B) of expression of *Plet1* protein in ovarian tissue of rats in two groups detected by Western blotting method

系统分析了*Plet1*在正常大鼠卵巢组织中的表达及其分布,观察其在PCOS大鼠模型中的差异表达,并探讨其对大鼠卵巢颗粒细胞增殖功能的调控作用,以揭示*Plet1*在PCOS发病机制中的潜在作用。本研究结果显示:大鼠卵巢组织中*Plet1*主要表达于卵巢颗粒细胞和黄体细胞中,*Plet1* mRNA表达水平与发情周期无关,提示*Plet1*可能参与调控卵巢功能的病理生理过程;与正常组大鼠比较,PCOS模型大鼠卵巢内*Plet1* mRNA和蛋白表达水



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图6 转染后各组大鼠卵巢颗粒细胞中*Plet1* mRNA表达水平

Fig. 6 Expression levels of *Plet1* mRNA in ovarian granulosa cells of rats in various groups after transfection

表3 RT-qPCR法检测2组大鼠卵巢颗粒细胞*CDK6*和*P53* mRNA表达水平

Tab. 3 Expression levels of *CDK6* and *P53* mRNA in rat ovarian granulosa cells in two groups detected by RT-qPCR method ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Group	<i>CDK6</i>	<i>P53</i>
Control	1.037±0.080	1.050±0.014
Si-Plet1-rat-383	0.787±0.060*	0.670±0.057**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control group.

平均明显降低,且干扰*Plet1*表达后,si-*Plet1*-rat-383组大鼠卵巢颗粒细胞增殖活性降低,细胞中*CDK6*和*P53* mRNA表达水平明显降低,以上结果均表明*Plet1*可能通过调控细胞周期相关基因影响卵巢颗粒细胞增殖。

*Plet1*基因在牛、羊、大鼠和小鼠等多种生物的胎盘组织中均有表达,尽管其功能尚未完全明确,但已有研究^[5, 19-22]表明:*Plet1*可能与组织损伤修复、细胞增殖和分化有关,并对细胞的迁移和黏附能力产生影响。为研究*Plet1*在胎盘中的作用,BROOKS等^[7]采用转录组学分析羊妊娠期腺上皮和胚胎组织,研究显示:*Plet1*在妊娠第20天的胚胎中表达水平最高。ZHAO等^[8]研究显示:在猪胎盘组织和14日龄胚胎中可检测到*Plet1*基因表达,在胚胎从球状发育至附植前期的细长形态阶段,*Plet1*表达水平明显上升,提示该基因可能在胚胎伸长和附植过程中发挥重要作用。研究^[6]表明:

在胚胎着床阶段, Plet1在牛子宫组织内的表达水平明显升高;在发情阶段, Plet1主要定位于子宫基质细胞;当胚胎成功附植后,其表达主要集中于子宫腔上皮细胞和腺体上皮细胞,且表达水平明显升高。研究^[8]显示:在妊娠第8.5天的小鼠胚胎中, *Plet1*基因可在胚胎中被检测到, Plet1蛋白主要定位于迷路层中紧密围绕母体静脉窦周围的滋养层细胞区域和糖原含量丰富的滋养层细胞内;在整个妊娠期间, Plet1在胎盘组织中持续表达,提示其可能参与维持母体与胎盘在孕期之间的相互作用及妊娠过程的调控。

研究^[10]显示:小鼠胚胎干细胞中 *Plet1*基因表达可能受到DNA甲基化修饰的抑制,然而其表达在滋养层干细胞及滋养巨细胞表面则呈现恢复状态,表明 Plet1在影响小鼠胎盘滋养层细胞分化过程中可能起关键作用,并参与维持滋养细胞自我更新与分化平衡的调控机制。研究^[23]显示:在母猪妊娠第15、26、50和95天的滋养细胞中均可检测到 *Plet1* mRNA及其蛋白的表达,表明 Plet1可作为猪滋养层细胞的特异性分子标志物;在妊娠过程中,猪胎盘组织中 Plet1-L转录本表达水平明显升高, Plet1蛋白由滋养层细胞的胞质转移至顶端结构,提示 Plet1参与滋养层细胞与子宫内膜上皮层的相互作用。PERVIZAJ-ORUQAJ等^[9]研究显示: Plet1由肺泡巨噬细胞释放,并通过诱导肺泡上皮细胞增殖和上皮屏障修复,在肺修复过程中可作为巨噬细胞-上皮相互作用的重要介质,在疾病早期气管内给予重组 Plet1蛋白可减轻病毒性肺损伤,提高小鼠存活率,显示出其潜在临床应用价值。

综上所述, Plet1蛋白在正常大鼠卵巢组织中表达分布主要集中于卵巢颗粒细胞和黄体细胞。PCOS模型大鼠卵巢组织内 *Plet1* mRNA表达下调,干扰 Plet1表达可抑制大鼠卵巢颗粒细胞增殖。但 Plet1能否作为预测PCOS患者不良妊娠结局的生物标志物,仍需进一步研究。

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:

付璐璐参与实验操作及论文撰写,邹颖刚参与实验设计和论文修改,郑晓宇、张雪莹和张京顺参与数据整理及统计学分析,王敏和张媵参与实验操作,郑连文参与论文指导和审阅。

[参考文献]

- [1] ALENEZI S A, KHAN R, AMER S. The impact of high BMI on pregnancy outcomes and complications in women with PCOS undergoing IVF-a systematic review and meta-analysis[J]. *J Clin Med*, 2024, 13(6): 1578.
- [2] COLLÉE J, MAWET M, TEBACHE L, et al. Polycystic ovarian syndrome and infertility: overview and insights of the putative treatments [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2021, 37(10): 869-874.
- [3] CHOUDHURY A A, RAJESWARI V D. Polycystic ovary syndrome (PCOS) increases the risk of subsequent gestational diabetes mellitus (GDM): a novel therapeutic perspective[J]. *Life Sci*, 2022, 310: 121069.
- [4] 曹欢易, 关海霞, 傅晓莹. 内分泌疾病与非酒精性脂肪性肝病[J]. *中国实用内科杂志*, 2024, 44(1): 11-16.
- [5] KARRICH J J, ROMERA-HERNÁNDEZ M, PAPA ZIAN N, et al. Expression of Plet1 controls interstitial migration of murine small intestinal dendritic cells[J]. *Eur J Immunol*, 2019, 49(2): 290-301.
- [6] MANSOURI-ATTIA N, AUBERT J, REINAUD P, et al. Gene expression profiles of bovine caruncular and intercaruncular endometrium at implantation[J]. *Physiol Genomics*, 2009, 39(1): 14-27.
- [7] BROOKS K, BURNS G W, MORAES J G N, et al. Analysis of the uterine epithelial and conceptus transcriptome and luminal fluid proteome during the peri-implantation period of pregnancy in sheep [J]. *Biol Reprod*, 2016, 95(4): 88.
- [8] ZHAO S H, SIMMONS D G, CROSS J C, et al. *PLET1* (C11orf34), a highly expressed and processed novel gene in pig and mouse placenta, is transcribed but poorly spliced in human[J]. *Genomics*, 2004, 84(1): 114-125.
- [9] PERVIZAJ-ORUQAJ L, SELVAKUMAR B, FERRERO M R, et al. Alveolar macrophage-expressed Plet1 is a driver of lung epithelial repair after viral pneumonia[J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 87.
- [10] MURRAY A, SIENERTH A R, HEMBERGER M. Plet1 is an epigenetically regulated cell surface protein that provides essential cues to direct trophoblast stem cell differentiation[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 25112.
- [11] LUO M C, LAI W L, HE Z M, et al. Development of an optimized culture system for generating mouse alveolar macrophage-like cells[J]. *J Immunol*, 2021, 207(6): 1683-1693.
- [12] EVERTS R E, CHAVATTE-PALMER P, RAZZAK A,

- et al. Aberrant gene expression patterns in placentomes are associated with phenotypically normal and abnormal cattle cloned by somatic cell nuclear transfer[J]. *Physiol Genomics*, 2008, 33(1): 65-77.
- [13] FU L L, XU Y, LI D D, et al. Expression profiles of mRNA and long noncoding RNA in the ovaries of letrozole-induced polycystic ovary syndrome rat model through deep sequencing[J]. *Gene*, 2018, 657: 19-29.
- [14] 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.
- [15] PALOMBA S, PILTONEN T T, GIUDICE L C. Endometrial function in women with polycystic ovary syndrome: a comprehensive review [J]. *Hum Reprod Update*, 2021, 27(3): 584-618.
- [16] STENER-VICTORIN E, TEEDE H, NORMAN R J, et al. Polycystic ovary syndrome [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2024, 10: 27.
- [17] TONG C, WU Y, ZHANG L L, et al. Insulin resistance, autophagy and apoptosis in patients with polycystic ovary syndrome: Association with PI3K signaling pathway [J]. *Front Endocrinol*, 2022, 13: 1091147.
- [18] AJMAL N, KHAN S Z, SHAIKH R. Polycystic ovary syndrome (PCOS) and genetic predisposition: a review article [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol X*, 2019, 3: 100060.
- [19] ZEPP J A, ZHAO J J, LIU C N, et al. IL-17A-induced PLET1 expression contributes to tissue repair and colon tumorigenesis [J]. *J Immunol*, 2017, 199(11): 3849-3857.
- [20] KLOEPPER J E, BARIS O R, REUTER K, et al. Mitochondrial function in murine skin epithelium is crucial for hair follicle morphogenesis and epithelial-mesenchymal interactions [J]. *J Invest Dermatol*, 2015, 135(3): 679-689.
- [21] ANDREWS N, SERVISS J T, GEYER N, et al. An unsupervised method for physical cell interaction profiling of complex tissues [J]. *Nat Methods*, 2021, 18(8): 912-920.
- [22] LI J, WACHSMUTH L P, XIAO S Y, et al. Foxn1 overexpression promotes thymic epithelial progenitor cell proliferation and mTEC maintenance, but does not prevent thymic involution [J]. *Development*, 2023, 150(8): dev200995.
- [23] TENG L, HONG L J, LIU R Z, et al. Cellular localization and regulation of expression of the *PLET1* gene in porcine placenta [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(12): 2048.