

短链脂肪酸对炎症诱导多囊卵巢综合征卵巢颗粒细胞自噬损伤的改善作用及其机制

胡英, 黄勇

(海南医科大学第二附属医院生殖医学科, 海南 海口 570100)

[摘要] **目的:** 探讨短链脂肪酸 (SCFAs) 对多囊卵巢综合征 (PCOS) 卵巢颗粒细胞损伤的改善作用, 并阐明其可能的作用机制。**方法:** 分别从 PCOS 患者和非 PCOS 患者的卵泡液中提取卵巢颗粒细胞, 采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 和 Western blotting 法检测 2 种细胞中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、干扰素 γ (IFN- γ)、白细胞介素 (IL)-6 和 IL-18 mRNA 和蛋白表达水平, Western blotting 法检测 2 种细胞中微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC3)-II/LC3-I 比值和泛素结合蛋白 p62 表达水平。使用不同浓度 (0、6、12、24 和 48 mmol·L⁻¹) 3 种 SCFAs 乙酸钠 (NaA)、丙酸钠 (NaP) 及丁酸钠 (NaB) 分别处理人卵巢颗粒细胞 KGN, 采用细胞计数试剂盒 8 (CCK-8) 法检测 3 种 SCFAs 作用后正常 KGN 细胞增殖活性。取人卵巢颗粒细胞 KGN, 分为对照组、脂多糖 (LPS) 组 (1 mg·L⁻¹ LPS)、NaA+LPS 组 (48 mmol·L⁻¹ NaA+1 mg·L⁻¹ LPS)、NaP+LPS 组 (48 mmol·L⁻¹ NaP+1 mg·L⁻¹ LPS)、NaB+LPS 组 (48 mmol·L⁻¹ NaB+1 mg·L⁻¹ LPS)。采用 CCK-8 法检测各组细胞增殖活性, 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 法检测各组细胞上清液中雌二醇 (E₂) 和孕酮 (P) 水平, RT-qPCR 法检测各组细胞中 TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 和 IL-18 mRNA 表达水平, Western blotting 法检测各组细胞中 TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 和 IL-18 蛋白表达水平和 LC3-II/LC3-I 比值及 p62 蛋白表达水平。**结果:** 与非 PCOS 患者比较, PCOS 患者卵巢颗粒细胞中 TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 和 IL-18 mRNA 及蛋白表达水平明显升高 ($P<0.05$), LC3-II/LC3-I 比值升高 ($P<0.05$), p62 蛋白表达水平降低 ($P<0.05$)。与对照组比较, 经不同浓度 (6、12、24 和 48 mmol·L⁻¹) NaA、NaP 和 NaB 处理后各组 KGN 细胞增殖活性差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与 LPS 组比较, NaA+LPS 组、NaP+LPS 组和 NaB+LPS 组细胞增殖活性均升高 ($P<0.05$), 细胞上清液中 E₂ 和 P 水平升高 ($P<0.05$), 细胞中 TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 和 IL-18 mRNA 表达水平降低 ($P<0.05$), LC3-II/LC3-I 比值降低 ($P<0.05$), p62 蛋白表达水平升高 ($P<0.05$)。**结论:** PCOS 患者卵巢颗粒细胞中炎症因子水平升高, 并诱导细胞自噬。SCFAs 可改善炎症诱导下的卵巢颗粒细胞自噬性损伤, 提高细胞增殖活性。

[关键词] 多囊卵巢综合征; 卵巢颗粒细胞; 短链脂肪酸; 炎症; 细胞自噬; 炎症因子

[中图分类号] R711.75 **[文献标志码]** A

[收稿日期] 2024-09-18 **[录用日期]** 2024-12-14

[基金项目] 海南省卫健委卫生健康行业科研项目 (21A200178)

[作者简介] 胡英 (1982—), 女, 湖北省孝感市人, 副主任医师, 主要从事生殖内分泌方面的研究。

[通信作者] 胡英, 副主任医师 (E-mail: zhe446@sina.com)

©《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.

Improvement effect of short-chain fatty acids on inflammation-induced autophagic damage in ovarian granulosa cells in polycystic ovary syndrome and its mechanism

HU Ying, HUANG Yong

(Department of Reproductive Medicine, Second Affiliated Hospital, Hainan Medical University, Haikou 570100, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the improvement effect of short-chain fatty acids (SCFAs) on the injury of ovarian granulosa cells in polycystic ovary syndrome (PCOS), and to clarify its possible mechanism. **Methods:** The ovarian granulosa cells were extracted from the follicular fluid of PCOS patients and non-PCOS patients, respectively. Real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blotting methods were used to detect the expression levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon γ (IFN- γ), interleukin (IL)-6, and IL-18 mRNA and proteins in the two kinds of cells; Western blotting method was used to detect the microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3)- II /LC3- I ratios and ubiquitin-binding protein p62 expression levels in two types of cells. The human ovarian granulosa cells KGN were treated with three kinds of SCFAs sodium acetate (NaA), sodium propionate (NaP), and sodium butyrate (NaB) at different concentrations (0, 6, 12, 24, and 48 mmol·L⁻¹), respectively. Cell counting kit-8 (CCK-8) method was used to detect the proliferation activities of normal KGN cells after treated with three kinds of SCFAs. The human ovarian granulosa cells KGN were taken and divided into control group, lipopolysaccharide (LPS) group (1 mg·L⁻¹ LPS), NaA+LPS group (48 mmol·L⁻¹ NaA+1 mg·L⁻¹ LPS), NaP+LPS group (48 mmol·L⁻¹ NaP+1 mg·L⁻¹ LPS), and NaB+LPS group (48 mmol·L⁻¹ NaB+1 mg·L⁻¹ LPS). CCK-8 method was used to detect the proliferation activities of the cells in various groups; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the levels of estradiol (E2) and progesterone (P) in supernatant of the cells in various groups; RT-qPCR method was used to detect the expression levels of TNF- α , IFN- γ , IL-6, and IL-18 mRNA in the cells in various groups; Western blotting method was used to detect the the expression levels of TNF- α , IFN- γ , IL-6, and IL-18 proteins and LC3- II /LC3- I ratios and p62 protein expression levels in the cells in various groups. **Results:** Compared with non-PCOS patients, the mRNA and protein expression levels of TNF- α , IFN- γ , IL-6, and IL-18 in the ovarian granulosa cells of PCOS patients were significantly increased ($P < 0.05$), the LC3- II /LC3- I ratio was increased ($P < 0.05$), and the p62 protein expression level was decreased ($P < 0.05$). Compared with control group, there were no significant differences in the proliferation activities of the KGN cells in various groups after treated with different concentrations (6, 12, 24, and 48 mmol·L⁻¹) of NaA, NaP, and NaB ($P > 0.05$). Compared with LPS group, the proliferation activities of the cells in NaA+LPS group, NaP+LPS group, and NaB+LPS group were increased ($P < 0.05$), the levels of E2 and P in the cell supernatant were increased ($P < 0.05$), the expression levels of TNF- α , IFN- γ , IL-6, and IL-18 mRNA in the cells were decreased ($P < 0.05$), the LC3- II /LC3- I ratio was decreased ($P < 0.05$), and the p62 protein expression level was increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** The levels of inflammatory factors are increased in the ovarian granulosa cells of PCOS patients and induce cell autophagy. SCFAs can improve the inflammatory-induced autophagic injury of ovarian granulosa cells and increase the cell proliferation activity.

KEYWORDS Polycystic ovary syndrome; Ovarian granulosa cells; Short-chain fatty acids; Inflammation; Cell autophagy; Inflammatory factor

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 是育龄期女性中最常见的内分泌疾病,其特征包括雄激素过多、排卵功能失调和多囊卵巢形态,并伴有代谢异常(如胰岛素抵抗和肥胖)^[1]。据2023年美国国立卫生研究院统计,全球30%~60%的PCOS患者因排卵功能障碍继发不孕症,严重影响患者的生活质量及生育^[2]。近年来,辅助生殖技术迅速发展,已成为解决PCOS患者不孕问题的重要途径,然而部分PCOS患者在辅助生殖技术治疗后仍未获得满意的临床结果,这主要归因于卵泡的异常发育^[3]。因此,探讨PCOS患者卵泡发育异常的分子机制,寻找改善PCOS患者卵子质量的方法,对改善PCOS患者妊娠结局具有重要意义。

在正常的卵泡发育过程中,颗粒细胞为其提供营养支持并驱动分泌相关生长因子。研究^[4-5]表明:卵巢微环境的异常变化(如促炎途径激活)会损害颗粒细胞的正常生理状态,成为后续PCOS卵泡发育障碍的主要原因。与健康女性比较,PCOS患者卵巢中炎症因子水平明显升高,表明PCOS患者的卵巢微环境处于炎症反应状态^[6]。研究^[7]显示:卵泡中炎症水平升高会导致颗粒细胞功能障碍,从而干扰卵母细胞的正常发育。自噬是真核生物中高度保守的细胞内降解途径,通过降解多余的蛋白质、脂质和细胞器来维持细胞稳态,在各种病理生理过程中发挥适应性调节作用。然而也有研究^[8-9]表明:PCOS患者和大鼠的颗粒细胞中自噬增加,这可能与持续的慢性炎症反应有关。

短链脂肪酸(short-chain fatty acids, SCFAs)是一类有机脂肪酸,主要由肠道微生物群通过厌氧发酵难消化的碳水化合物产生。乙酸钠(sodium acetate, NaA)、丙酸钠(sodium propionate, NaP)和丁酸钠(sodium butyrate, NaB)为SCFAs的主要成分,参与免疫、炎症、细胞凋亡和脂质代谢等过程^[10]。研究^[11]表明:SCFAs可通过多种机制参与PCOS的发生发展,但其与PCOS中颗粒细胞自噬改变的关系有待进一步探讨。本研究通过检测PCOS患者颗粒细胞中炎症因子表达及自噬情况,探讨SCFAs对炎症诱导下颗粒细胞自噬水平的调控作用,为PCOS的治疗提供新思路。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选择50例2022年6月—2023年12月在本院进行体外受精和胚胎移植的PCOS患者作为研究对象。PCOS诊断根据2003年鹿特丹诊

断标准:①稀发排卵或无排卵;②临床和(或)高雄激素血症的生化体征;③B超显示在月经周期或黄体酮撤退后出血3~5 d检查发现双侧卵巢均有直径2~9 mm的卵泡 ≥ 12 个和(或)卵巢体积 ≥ 10 cm³,出现以上3项或2项即判定为PCOS。选择同期卵巢功能正常但因输卵管不通进行体外受精和胚胎移植的50例非PCOS患者作为对照。PCOS患者年龄22~35岁,平均年龄(28.6 \pm 3.2)岁;非PCOS患者年龄23~34岁,平均年龄(28.4 \pm 3.4)岁。受试者近3个月内均未服用任何激素类药物,排除甲状腺疾病、其他内分泌疾病如高催乳素血症、雄激素分泌肿瘤、库欣综合征和非典型先天性肾上腺增生。本研究经本院伦理委员会审核批准(伦理批准号:202112-09),所有患者对研究知情同意并签署知情同意书。

1.2 细胞、主要试剂和仪器 KGN细胞从患者获得。胎牛血清购自南京森贝伽生物科技有限公司,青霉素、链霉素和DMEM/F-12细胞培养液购自杭州昊鑫生物科技股份有限公司,NaA、NaP和NaB购自上海佰利莱生物科技有限公司,TRIzol试剂盒和Talent荧光定量检测试剂盒购自北京天根生化科技有限公司,免疫沉淀分析(radio-immunoprecipitation assay, RIPA)裂解液购自广州博鹭腾生物科技有限公司,二辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白浓度测定试剂盒、超敏型化学发光液和细胞计数试剂盒8(cell counting kit-8, CCK-8)试剂购自上海碧云天生物研究所,雌二醇(estradiol, E₂)和孕酮(progesterone, P)的酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测试剂盒购自上海抚生生物科技有限公司,聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride membrane, PVDF)购自美国Millipore公司,肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)抗体、干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ)抗体、白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)抗体、白细胞介素18(interleukin-18, IL-18)抗体、微管相关蛋白1轻链3型蛋白II(microtubule-associated protein 1-light chain 3-II, LC3-II)抗体、微管相关蛋白1轻链3型蛋白I(microtubule-associated protein 1-light chain 3-I, LC3-I)抗体、自噬适配体蛋白p62抗体和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(immunoglobulin G, IgG)抗体均购自英国Abcam公司。NanoDrop 400

分光光度计购自北京原平皓生物技术有限公司, Multiskan FC 酶标仪购自美国 Thermofisher 公司, 7900HT/FAST 型荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司, 凝胶成像仪购自上海天能科技有限公司。

1.3 原代卵巢颗粒细胞 KGN 提取与培养 在 50 例 PCOS 患者与 50 例非 PCOS 患者的取卵日收集 2 组患者卵泡液, $2\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 去除上清, 在沉淀中加入磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS), 吹打混匀, 缓慢加入等体积的样本密度分离液, $2\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min; 吸取中间白色膜状层, 加入 PBS 缓冲液混匀后, $1\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 重复 1 次。将所得沉淀接种于培养皿, 添加含 10% 胎牛血清、1% 青-链霉素的 DMEM/F-12 细胞培养液重悬, 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中过夜培养, PBS 缓冲液清洗细胞, 更换为新鲜培养基培养。采用实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 和 Western blotting 法检测提取的 2 种卵巢颗粒细胞中炎症因子 TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 和 IL-18 mRNA 及蛋白表达水平, Western blotting 法检测提取的 2 种卵巢颗粒细胞中 LC3-I、LC3-II 和 p62 蛋白表达水平。

1.4 KGN 炎症细胞模型建立和分组 将人卵巢颗粒 KGN 细胞随机分为对照组、LPS 组、NaA+LPS 组、NaP+LPS 组和 NaB+LPS 组。对照组: 细胞正常培养; LPS 组: 使用 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS 处理细胞 24 h, 以诱导炎症模型^[12]; NaA+LPS 组: 使用 $48\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaA 孵育细胞 24 h, 再用 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS 处理细胞 24 h; NaP+LPS 组: 使用 $48\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaP 孵育细胞 24 h, 再用 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS 处理细胞 24 h; NaB+LPS 组: 使用 $48\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaB 孵育细胞 24 h, 再用 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS 处理细胞 24 h。处理结束后, 收集上述 5 组细胞。

1.5 RT-qPCR 法检测各组细胞中炎症因子 mRNA 表达水平 采用 TRIzol 法提取 2 组患者原代颗粒细胞和 KGN 细胞中总 RNA, NanoDrop 分光光度计测定 RNA 浓度, 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。按照反转录试剂盒说明书, 配置反转录体系, 合成底物 cDNA。进行 RT-qPCR 扩增, 根据 Talent 荧光定量检测试剂盒说明书, 于冰上配制反应混合液, 分别加入 TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 和 IL-18 的上下游引物, 设置扩增程序为 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、2 min, 1 个循环; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、20 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、20 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 40 个

循环。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 作为内参基因, 根据扩增曲线和溶解曲线, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各样本中目的基因表达水平, 实验重复 3 次。引物序列见表 1。

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

Primer	Sequence (5'-3')
TNF- α	F:CCTCTCTCTAATCAGCCCTCTG
	R:GAGGACCTGGGAGTAGATGAG
IFN- γ	F:GAGTGTGGAGACCATCAAGGAAG
	R:TGCTTTGCGTTGGACATTCAAGTC
IL-6	F:ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG
	R:CCATCTTTGGAAGGTTTCAGGTTG
IL-18	F:TGGCTGCTGAACCAAGTAGAA
	R:ATAGAGGCCGATTTTCCTTGG
GAPDH	F:CCAGGTGGTCTCCTCTGA
	R:GCTGTAGCCAAATCGTTGT

1.6 Western blotting 法检测各组细胞中炎症因子和自噬相关蛋白表达水平 收集患者原代颗粒细胞和 KGN 细胞, 加入 RIPA 裂解液, 于冰上静置 10 min, 提取总蛋白, BCA 法检测蛋白浓度。配制 PAGE 分离胶及浓缩胶, 取等量 $20\text{ }\mu\text{g}$ 蛋白样品上样, 电泳分离, 电转至 PVDF 膜上。将 PVDF 膜浸泡于 5% 脱脂奶粉中, 室温孵育 2 h。分别加入稀释后 TNF- α (1:1 000)、IFN- γ (1:1 000)、IL-6 (1:1 000)、IL-18 (1:5 000)、LC3-II (1:1 000)、LC3-I (1:1 000) 和 p62 (1:5 000) 一抗, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜。次日, 将膜置于相应辣根过氧化物酶标记的 IgG 抗体中 (1:5 000), 室温摇床孵育 2 h。取超敏型化学发光液, 于暗室条件下将反应液滴加于膜上, 室温显色, 将膜置于凝胶成像系统中拍照, 使用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/GAPDH 条带灰度值, 实验重复 3 次。

1.7 SCFAs 处理 KGN 细胞 在 KGN 细胞中添加含 10% 胎牛血清和 1% 青-链霉素的 DMEM/F-12 细胞培养液, 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中常规传代培养。将对数生长期的细胞按照每孔 1×10^4 个的密度接种于 96 孔细胞培养板中, 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中过夜培养。分别使用不同浓度 (0、6、12、24 和 $48\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) NaA、NaP 及 NaB 孵育细胞 24 h, 以 $0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度作为对照组, 每个浓

度设置6个复孔。处理结束后,收集各组细胞。

1.8 CCK-8法检测各组细胞增殖活性 各孔KGN细胞中加入CCK-8试剂10 μL ,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养2 h后,使用酶标仪检测450 nm波长处各组吸光度(A)值,计算细胞增殖活性。细胞增殖活性=处理组A值/对照组A值 $\times 100\%$ 。

1.9 ELISA法测定各组KGN细胞培养上清液中 E_2 和P水平 按“1.4”步骤分组处理KGN细胞后,收集各组细胞培养液,4 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,获取上清液于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存待用。采用ELISA法检测细胞培养上清液中 E_2 和P水平,设置空白孔、标准孔和待测样品孔,进行加样处理,每组设置3个重复孔,所有操作按照试剂盒说明书进行。

1.10 统计学分析 采用SPSS 23.0统计软件进行统计学分析。非PCOS患者与PCOS患者原代卵巢颗粒KGN细胞中TNF- α 、IFN- γ 、IL-6和IL-18 mRNA及蛋白表达水平,LC3-II/LC3-I比值和p62蛋白表达水平,3种不同浓度SCFAs处理后KGN细胞增殖活性以及细胞上清液中 E_2 和P水平,均符合正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间样本均数比较采用单因素方差分析,组间样本均数两两比较采用

LSD- t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

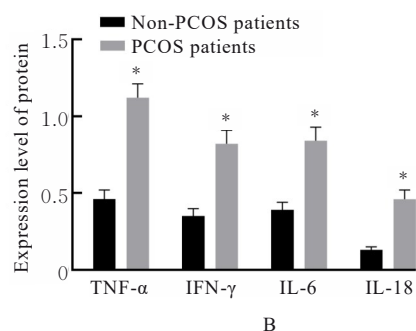
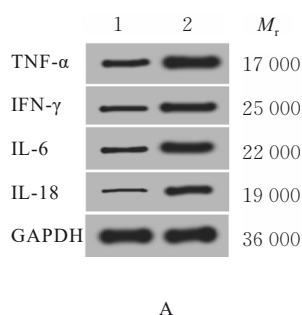
2.1 非PCOS患者与PCOS患者原代卵巢颗粒细胞中炎症因子mRNA和蛋白表达水平 与非PCOS患者比较,PCOS患者卵巢颗粒细胞中炎症因子TNF- α 、IFN- γ 、IL-6和IL-18 mRNA表达水平均明显升高($P<0.05$)。见表2。与非PCOS患者比较,PCOS患者卵巢颗粒细胞中炎症因子TNF- α 、IFN- γ 、IL-6和IL-18蛋白表达水平明显升高($P<0.05$)。见图1。

表2 非PCOS患者和PCOS患者卵巢颗粒细胞中TNF- α 、IFN- γ 、IL-6及IL-18 mRNA表达水平

Tab. 2 Expression levels of TNF- α , IFN- γ , IL-6 and IL-18 mRNA in ovarian granulosa cells of non-PCOS patients and PCOS patients ($n=3, \bar{x}\pm s$)

Patient	TNF- α	IFN- γ	IL-6	IL-18
Non-PCOS	1.00 \pm 0.06	1.00 \pm 0.07	1.00 \pm 0.06	1.00 \pm 0.05
PCOS	2.64 \pm 0.28*	2.06 \pm 0.23*	1.81 \pm 0.21*	1.70 \pm 0.19*

* $P<0.05$ compared with non-PCOS patients.



Lane 1: Non-PCOS patients; Lane 2: PCOS patients. * $P<0.05$ compared with non-PCOS patients.

图1 Western blotting法检测非PCOS患者和PCOS患者卵巢颗粒细胞中炎症因子蛋白表达电泳图(A)及直条图(B)
Fig. 1 Electrophoregram(A) and histogram(B) of expressions of inflammatory factor proteins in ovarian granulosa cells of non-PCOS patients and PCOS patients detected by Western blotting method

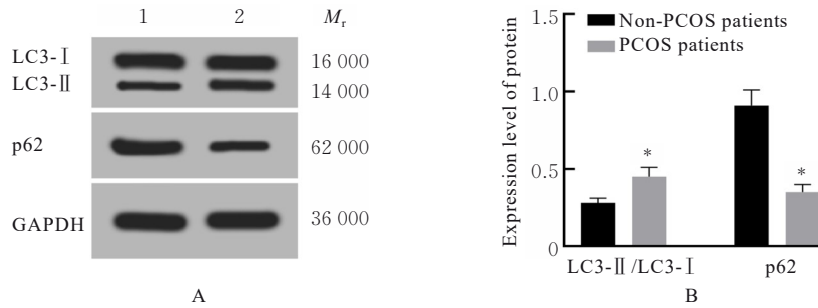
2.2 非PCOS患者与PCOS患者原代卵巢颗粒细胞中自噬相关蛋白表达水平 与非PCOS患者比较,PCOS患者卵巢颗粒细胞中LC3-II/LC3-I蛋白比值明显升高($P<0.05$),p62蛋白表达水平明显降低($P<0.05$)。见图2。

2.3 不同浓度SCFAs作用后KGN细胞增殖活性 与对照组比较,不同浓度NaA、NaP和NaB组KGN细胞增殖活性差异无统计学意义($P>0.05$),提示正常情况下NaA、NaP和NaB对KGN细胞增殖

活性无明显影响。见表3。

2.4 3种SCFAs作用后各组KGN细胞增殖活性 与对照组比较,LPS组KGN细胞增殖活性明显降低($P<0.05$);与LPS组比较,NaA+LPS组、NaP+LPS组和NaB+LPS组细胞增殖活性明显升高($P<0.05$)。见图3。

2.5 3种SCFAs作用后各组KGN细胞上清液中 E_2 与P水平 与对照组比较,LPS组KGN细胞上清液中 E_2 和P水平明显降低($P<0.05$);与LPS组



Lane 1: Non-PCOS patients; Lane 2: PCOS patients. * $P < 0.05$ compared with Non-PCOS patients.

图2 Western blotting法检测非PCOS患者和PCOS患者卵巢颗粒细胞中自噬相关蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 2 Electrophoregram(A) and histogram(B) of expressions of autophagy-related proteins in ovarian granulosa cells of non-PCOS patients and PCOS patients detected by Western blotting method

表3 不同浓度NaA、NaP和NaB处理后KGN细胞增殖活性

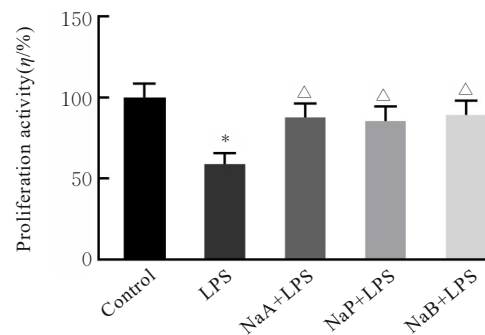
Tab. 3 Proliferation activities of KGN cells after treated with different concentrations of NaA, NaP and NaB

($n=6, \bar{x} \pm s, \eta/\%$)

Group	Proliferation activity
NaA ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	
0	100.00 ± 11.07
6	99.61 ± 10.25
12	99.02 ± 9.53
24	98.86 ± 10.85
48	98.57 ± 10.32
NaP ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	
0	100.00 ± 10.55
6	99.86 ± 10.14
12	99.25 ± 10.19
24	98.73 ± 9.96
48	98.49 ± 9.87
NaB ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	
0	100.00 ± 10.81
6	99.75 ± 10.22
12	99.46 ± 10.10
24	98.60 ± 9.88
48	98.51 ± 10.03

比较, NaA+LPS组、NaP+LPS组和NaB+LPS组细胞上清液中 E_2 和P水平明显升高 ($P < 0.05$)。见表4。

2.6 3种SCFAs作用下各组KGN细胞炎症因子表达水平 与对照组比较, LPS组KGN细胞中炎症因子TNF- α 、IFN- γ 、IL-6和IL-18 mRNA表达水平均明显升高 ($P < 0.05$); 与LPS组比较, NaA+LPS组、NaP+LPS组和NaB+LPS组细胞中TNF- α 、IFN- γ 、IL-6和IL-18 mRNA表达水平



* $P < 0.05$ compared with control group; $\Delta P < 0.05$ compared with LPS group.

图3 各组KGN细胞增殖活性

Fig. 3 Proliferation activities of KGN cells in various groups

表4 各组KGN细胞上清液中 E_2 和P水平

Tab. 4 Levels of E_2 and P in supernatant of KGN cells in various groups

($n=3, \bar{x} \pm s$)

Group	E_2 [$\rho_B/(\text{ng} \cdot \text{L}^{-1})$]	P [$\rho_B/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$]
Control	56.09 ± 6.48	13.93 ± 1.28
LPS	35.20 ± 3.67*	8.45 ± 0.92*
NaA+LPS	49.85 ± 5.14 Δ	11.96 ± 1.27 Δ
NaP+LPS	50.21 ± 5.13 Δ	12.05 ± 1.34 Δ
NaB+LPS	48.76 ± 4.99 Δ	12.01 ± 1.36 Δ

* $P < 0.05$ compared with control group; $\Delta P < 0.05$ compared with LPS group.

均明显降低 ($P < 0.05$)。见表5。

2.7 3种SCFAs作用后各组KGN细胞自噬相关蛋白表达水平 与对照组比较, LPS组KGN细胞中LC3-II/LC3-I比值明显升高 ($P < 0.05$), p62蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$); 与LPS组比较, NaA+LPS组、NaP+LPS组和NaB+LPS组细胞中

表5 各组KGN细胞中TNF- α 、IFN- γ 、IL-6和IL-18 mRNA表达水平

Tab. 5 Expression levels of TNF- α , IFN- γ , IL-6 and IL-18 mRNA in KGN cells in various groups ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Group	TNF- α	IFN- γ	IL-6	IL-18
Control	1.00 \pm 0.05	1.00 \pm 0.06	1.00 \pm 0.07	1.00 \pm 0.04
LPS	2.26 \pm 0.25*	1.89 \pm 0.21*	1.69 \pm 0.18*	1.88 \pm 0.20*
NaA+LPS	1.36 \pm 0.15 Δ	1.29 \pm 0.14 Δ	1.19 \pm 0.13 Δ	1.34 \pm 0.15 Δ
NaP+LPS	1.28 \pm 0.13 Δ	1.44 \pm 0.15 Δ	1.10 \pm 0.12 Δ	1.39 \pm 0.16 Δ
NaB+LPS	1.33 \pm 0.14 Δ	1.40 \pm 0.16 Δ	1.23 \pm 0.13 Δ	1.22 \pm 0.14 Δ

* $P<0.05$ compared with control group; $\Delta P<0.05$ compared with LPS group.

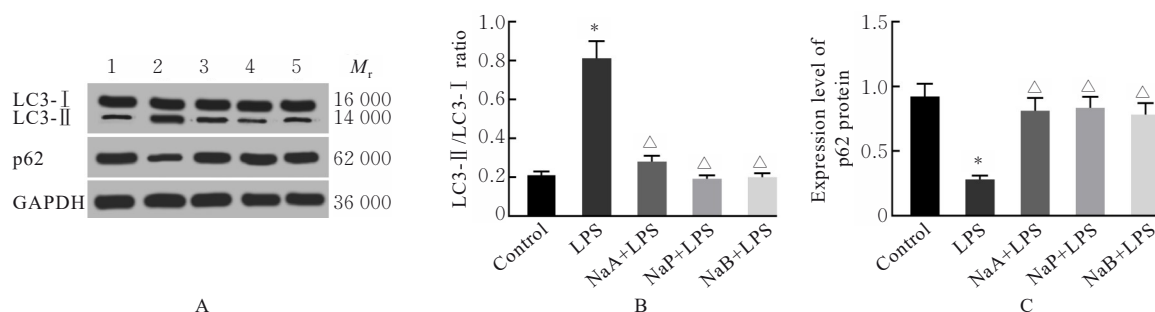
LC3-II/LC3-I 比值明显降低 ($P<0.05$), p62 蛋白表达水平明显升高 ($P<0.05$)。见图4。

3 讨论

PCOS作为一种常见的内分泌代谢疾病,影响约20%的育龄期女性。研究^[13-14]显示:PCOS伴随着炎症反应,慢性炎症也是PCOS的重要致病因素。PCOS患者的血清和卵巢颗粒细胞中促炎因子TNF- α 、IL-6、IL-18和IFN- γ 水平升高可诱导炎症状态,促进高雄激素血症和胰岛素抵抗的发生^[15]。此外,这些关键促炎因子表达上调会抑制颗粒细胞的增殖、分化和成熟。研究^[16]显示:PCOS患者机体中TNF- α 水平越高,胰岛素抵抗与糖脂代谢紊乱现象越严重。IL-6表达水平升高则与卵巢高雄激素的过量产生有关,还会促进颗粒细胞的凋亡^[17-18]。IL-18作为一种多效性促炎因子,与卵泡发育停滞有关,并影响卵泡膜细胞生长和类固醇生成^[19]。研究^[20]显示:PCOS患者外周血和血浆中IFN- γ

水平均升高,IFN- γ 可以抑制卵巢细胞增殖并促进卵巢颗粒细胞的凋亡。本研究从PCOS患者卵泡液中分离卵巢颗粒细胞,经检测发现PCOS颗粒细胞中炎症因子TNF- α 、IFN- γ 、IL-6和IL-18 mRNA及蛋白表达水平升高,证实了PCOS发病机制与炎症因子之间的联系,表明促炎因子TNF- α 、IFN- γ 、IL-6和IL-18等共同参与了PCOS的发生发展。

自噬在PCOS中发挥重要作用。生理状态下,自噬是维持卵母细胞发育、卵泡生长和分化、卵泡闭锁和生殖周期所必需的过程。而自噬受损与颗粒细胞数目下降、卵泡生成障碍和代谢紊乱有关联。研究^[21]表明:PCOS患者颗粒细胞自噬异常激活,导致卵泡发育和闭锁功能障碍,引起卵子数量和质量下降,严重损害患者的生育力。炎症与自噬之间的关系复杂而紧密:自噬功能缺陷可能导致线粒体功能紊乱,引发氧化应激和炎症反应;在PCOS慢性炎症状态下,自噬被持续激活,过度自噬会导致细胞过度降解,从而影响卵巢组织功能,进而加重炎症^[22]。因此,调控卵巢颗粒细胞自噬可能是PCOS干预的重要靶点。LC3是自噬中的关键蛋白,能够被具有蛋白内切酶活性的自噬相关蛋白4 (autophagy-related protein 4, ATG4) 剪切生成LC3-I。在自噬过程中,LC3-I经过其他自噬相关基因的修饰和加工,可形成脂质化形式的LC3-II,吸附于自噬体的膜上。因此,LC3-II/LC3-I比值是判断自噬水平的关键指标,与自噬程度呈正相关关系^[23]。p62是一种泛素结合蛋白,也是自噬的选择性底物,可与定位于自噬体内膜上的LC3-II结合形成复合物,一同在自噬溶酶体内降解。因此,



A: Electrophoregram (Lane 1: Control group; Lane 2: LPS group; Lane 3: NaA+LPS group; Lane 4: NaP+LPS group; Lane 5: NaB+LPS group); B, C: Histograms; B: LC3-II/LC3-I ratio; C: Expression level of p62 protein. * $P<0.05$ compared with control group; $\Delta P<0.05$ compared with LPS group.

图4 各组KGN细胞自噬相关蛋白表达电泳图(A)及直条图(B和C)

Fig. 4 Electrophoregram (A) and histograms (B, C) of expressions of autophagy-related proteins in KGN cells in various groups

在自噬激活时, p62蛋白不断被降解, 其表达水平降低; 当自噬功能缺陷或自噬活性降低时, 细胞质中p62蛋白累积, 其表达水平升高^[24]。本研究结果显示: PCOS患者颗粒细胞中LC3-II/LC3-I比值升高, p62蛋白表达水平降低, 提示PCOS患者颗粒细胞中自噬水平增加, 进一步说明自噬可能以激活状态参与PCOS发展。

研究^[25]显示: 炎症因子表达异常增加会对PCOS患者产生多种负面影响, 一方面, PCOS患者外周循环和卵巢组织中炎症因子的异常表达会诱发免疫功能障碍和排卵障碍; 另一方面, PCOS患者炎症因子水平升高会使得葡萄糖和脂质代谢紊乱以及肠道菌群失调所导致的SCFAs代谢异常。研究^[26]表明: PCOS患者中检测到3种主要SCFAs, 即NaA、NaP和NaB, 其水平明显低于健康对照者。已有研究^[27-28]表明: SCFAs可以降低炎症因子的表达, 改善胰岛素抵抗和肥胖, 缓解PCOS症状, 恢复卵巢功能。本研究结果显示: NaA、NaP和NaB能够提高KGN细胞增殖活性, 抑制细胞中TNF- α 、IFN- γ 、IL-6和IL-18等炎症因子的表达水平, 提示SCFAs对炎症诱导下的颗粒细胞发挥保护作用。此外, NaA、NaP和NaB作用后, KGN细胞中LC3-II/LC3-I比值降低, p62蛋白表达水平升高, 说明SCFAs能够抑制炎症诱导下卵巢颗粒细胞自噬。

雌激素在女性生殖系统中发挥重要作用, 主要负责调节月经周期和维持生育能力。PCOS患者雌激素分泌通常处于失衡状态。E₂是卵巢颗粒细胞分泌的主要雌激素之一, 其水平降低可能会导致卵泡发育不良和排卵障碍, 引发不孕^[29]。孕激素是维持妊娠的重要激素, 有助于调节子宫内膜变化以确保胚胎健康着床。PCOS患者常出现孕激素分泌不足, 从而导致月经不规律和无排卵等症状。在卵泡破裂后, 颗粒细胞在促性腺激素的作用下分化为黄体细胞并产生P, P水平过低会引起黄体功能不全及子宫内膜无法维持受精卵着床等情况, 增加流产或不孕风险^[30]。长期缺乏孕激素还可能导致雌激素持续刺激而造成内膜病变, 这种现象与PCOS的发病机制有密切关联^[31]。本研究结果显示: 在LPS诱导的KGN细胞炎症模型中E₂和P水平降低, 而NaA、NaP和NaB处理后KGN细胞中E₂及P水平升高, 表明SCFAs能够改善炎症诱导下的颗粒细胞激素分泌水平, 有助于缓解PCOS。

综上所述, PCOS患者卵巢颗粒细胞中TNF- α 、IFN- γ 、IL-6和IL-18等炎症因子表达水平升高, 细胞自噬水平增加; SCFAs能够提高炎症诱导下颗粒细胞的增殖活性, 抑制颗粒细胞过度自噬, 进而改善PCOS颗粒细胞的炎症状态。本研究结果可为PCOS的治疗提供新策略, 但本研究主要以体外模拟炎症微环境下的颗粒细胞为对象, 后期仍需通过动物体内实验进一步验证SCFAs在PCOS中的作用及其机制。

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:

胡英参与实验设计、论文撰写和修改, 黄勇参与实验操作、数据整理和统计学分析。

[参考文献]

- [1] SHRIVASTAVA S, CONIGLIARO R L. Polycystic ovarian syndrome[J]. *Med Clin N Am*, 2023, 107(2): 227-234.
- [2] XIE Q, HONG W L, LI Y, et al. Chitosan oligosaccharide improves ovarian granulosa cells inflammation and oxidative stress in patients with polycystic ovary syndrome[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1086232.
- [3] 朱瑞可, 孙婧, 史昊, 等. 血清基础黄体生成素水平对多囊卵巢综合征患者卵泡期长效方案助孕结局的影响[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2024, 59(6): 859-862.
- [4] ZHANG Q, REN J, WANG F F, et al. Mitochondrial and glucose metabolic dysfunctions in granulosa cells induce impaired oocytes of polycystic ovary syndrome through Sirtuin 3[J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 187: 1-16.
- [5] JOZKOWIAK M, PIOTROWSKA-KEMPISTY H, KOBYLAREK D, et al. Endocrine disrupting chemicals in polycystic ovary syndrome: the relevant role of the theca and granulosa cells in the pathogenesis of the ovarian dysfunction[J]. *Cells*, 2022, 12(1): 174.
- [6] BARREA L, MARZULLO P, MUSCOGIURI G, et al. Source and amount of carbohydrate in the diet and inflammation in women with polycystic ovary syndrome[J]. *Nutr Res Rev*, 2018, 31(2): 291-301.
- [7] LIU Y S, LIU H, LI Z T, et al. The release of peripheral immune inflammatory cytokines promote an inflammatory cascade in PCOS patients *via* altering the follicular microenvironment[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 685724.

- [8] 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.
- [9] LUO X D, GONG Y Y, CAI L Y, et al. Chemerin regulates autophagy to participate in polycystic ovary syndrome[J]. *J Int Med Res*, 2021, 49(11): 3000605211058376.
- [10] HE J, ZHANG P W, SHEN L Y, et al. Short-chain fatty acids and their association with signalling pathways in inflammation, glucose and lipid metabolism[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(17): 6356.
- [11] 王 怡, 杨宏毅, 杨焕焕. 短链脂肪酸在多囊卵巢综合征发生发展中的作用[J]. *中国卫生标准管理*, 2021, 12(4): 163-165.
- [12] 赵元元, 路军涛, 吴小华. 人脐带间充质干细胞外泌体 miR-100 对多囊卵巢综合征患者颗粒细胞炎症的影响[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2023, 61(5): 51-58.
- [13] PATEL S. Polycystic ovary syndrome (PCOS), an inflammatory, systemic, lifestyle endocrinopathy[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2018, 182: 27-36.
- [14] VELEZ L M, SELDIN M, MOTTA A B. Inflammation and reproductive function in women with polycystic ovary syndrome[J]. *Biol Reprod*, 2021, 104(6): 1205-1217.
- [15] RUDNICKA E, SUCHTA K, GRYMOWICZ M, et al. Chronic low grade inflammation in pathogenesis of PCOS[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(7): 3789.
- [16] 张梦蝶, 张欢欢, 肖成炜. 多囊卵巢综合征患者血清 TNF- α 改变和糖脂代谢异常关系的临床研究[J]. *现代医药卫生*, 2023, 39(7): 1141-1144.
- [17] PENG Z, SUN Y F, LV X L, et al. Interleukin-6 levels in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis[J]. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0148531.
- [18] LI L S, ZHU J, YE F J, et al. Upregulation of the lncRNA SRLR in polycystic ovary syndrome regulates cell apoptosis and IL-6 expression [J]. *Cell Biochem Funct*, 2020, 38(7): 880-885.
- [19] ZHANG H Y, ZHU F F, ZHU Y J, et al. Effects of IL-18 on the proliferation and steroidogenesis of bovine theca cells: Possible roles in the pathogenesis of polycystic ovary syndrome[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(2): 1128-1139.
- [20] 张丽娜, 王 娟, 姚 雪, 等. IFN- γ 在多囊卵巢综合征中的表达及对卵巢颗粒细胞的影响[J]. *江苏大学学报(医学版)*, 2020, 30(6): 480-485.
- [21] BHARDWAJ J K, PALIWAL A, SARAF P, et al. Role of autophagy in follicular development and maintenance of primordial follicular pool in the ovary[J]. *J Cell Physiol*, 2022, 237(2): 1157-1170.
- [22] ZHAO Y, ZHAO X X, JIANG T Y, et al. A retrospective review on dysregulated autophagy in polycystic ovary syndrome: from pathogenesis to therapeutic strategies[J]. *Horm Metab Res*, 2024, 56(8): 547-558.
- [23] POPELKA H, KLIONSKY D J. Structural basis for extremely strong binding affinity of giant ankyrins to LC3/GABARAP and its application in the inhibition of autophagy[J]. *Autophagy*, 2018, 14(11): 1847-1849.
- [24] LAMARK T, SVENNING S, JOHANSEN T. Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm[J]. *Essays Biochem*, 2017, 61(6): 609-624.
- [25] ZHANG M M, HU R N, HUANG Y J, et al. Present and future: crosstalks between polycystic ovary syndrome and gut metabolites relating to gut microbiota[J]. *Front Endocrinol*, 2022, 13: 933110.
- [26] ZHANG J C, SUN Z H, JIANG S M, et al. Probiotic *Bifidobacterium lactis* V9 regulates the secretion of sex hormones in polycystic ovary syndrome patients through the gut-brain axis[J]. *mSystems*, 2019, 4(2): e00017-19.
- [27] LIU K L, HE X, HUANG J Y, et al. Short-chain fatty acid-butyric acid ameliorates granulosa cells inflammation through regulating METTL3-mediated N6-methyladenosine modification of FOSL2 in polycystic ovarian syndrome[J]. *Clin Epigenetics*, 2023, 15(1): 86.
- [28] OLANIYI K S, BASHIR A M, ARELOEGBE S E, et al. Short chain fatty acid, acetate restores ovarian function in experimentally induced PCOS rat model[J]. *PLoS One*, 2022, 17(7): e0272124.
- [29] ZHANG H L, WANG W, ZHAO J M, et al. Relationship between body composition, insulin resistance, and hormonal profiles in women with polycystic ovary syndrome[J]. *Front Endocrinol*, 2023, 13: 1085656.
- [30] BULLETTI C, BULLETTI F M, SCIORIO R, et al. Progesterone: the key factor of the beginning of life[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(22): 14138.
- [31] FERREIRA S R, MOTTA A B. Uterine function: from normal to polycystic ovarian syndrome alterations[J]. *Curr Med Chem*, 2018, 25(15): 1792-1804.