

· 基础研究 ·

维生素D缺乏与多囊卵巢综合征发病机制的相关性研究

周加敏¹, 吴婷婷², 陈琳³, 陈燕^{4*}, 许波群^{1,3*}¹南京医科大学附属逸夫医院妇产科, 江苏 南京 211112; ²南京市红十字医院妇产科, 江苏 南京 210001; ³南京医科大学第二附属医院妇产科, 江苏 南京 210003; ⁴南京医科大学第四附属医院妇产科, 江苏 南京 210031

[摘要] 目的:探讨维生素D(vitamin D, VD)缺乏与多囊卵巢综合征(polycystic ovarian syndrome, PCOS)发病机制之间的关联。方法:检测34例PCOS患者和30例正常健康女性体内VD水平,并对其临床资料进行相关性分析;构建VD缺乏小鼠模型和PCOS小鼠模型,分为正常对照组(control, CTR组)、PCOS组、VD缺乏组(VD⁻组)、VD缺乏联合PCOS组(VD⁻+PCOS组)。观察各组小鼠动情周期及卵巢形态改变;检测小鼠血清性激素指标、糖脂代谢指标;实时定量聚合酶链反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)法检测各组小鼠卵巢组织中激素合成酶及性激素受体mRNA表达水平。结果:PCOS女性体内25-羟维生素D[25-hydroxyvitamin D, 25(OH)D]水平较正常健康女性明显降低[(16.49 ± 6.50)ng/mL vs. (20.08 ± 5.28)ng/mL, $P=0.019$]。PCOS组血清中黄体生成素(luteinizing hormone, LH)、睾酮(testosterone, TT)、黄体生成素与卵泡刺激素(follicular-stimulating hormone, FSH)比值即LH/FSH比值、游离雄激素指数(free androgen index, FAI)水平均明显高于对照组,性激素结合蛋白(sex hormone binding globulin, SHBG)水平明显低于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。相关性分析结果显示,总样本人群血清25(OH)D水平与LH($r=-0.271, P < 0.05$)、LH/FSH比值($r=-0.314, P < 0.05$)、TT($r=-0.276, P < 0.05$)、垂体泌乳素(prolactin, PRL)($r=-0.274, P < 0.05$)、FAI($r=-0.312, P < 0.05$)均呈负相关,PCOS患者血清25(OH)D水平与PRL存在负相关($r=-0.404, P < 0.05$)。VD缺乏使小鼠动情周期发生停滞;与CTR组相比,其余各组小鼠血清中LH水平明显升高($P < 0.05$);与CTR组相比,VD⁻组小鼠卵巢组织中雄激素受体(androgen receptor, AR)mRNA表达上调($P < 0.05$)。结论:PCOS患者存在VD缺乏现象,PCOS患者血清25(OH)D水平与PRL存在负相关关系。VD缺乏扰乱了小鼠正常动情周期并影响性激素水平,VD缺乏可能通过调节性激素受体表达来参与PCOS发生。

[关键词] 多囊卵巢综合征;维生素D;泌乳素;动情周期;黄体生成素;雄激素受体**[中图分类号]** R711.75**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2023)07-934-11**doi:** 10.7655/NYDXBNS20230706

Correlation between vitamin D deficiency and the pathogenesis of polycystic ovary syndrome

ZHOU Jiamin¹, WU Tingting², CHEN Lin³, CHEN Yan^{4*}, XU Boqun^{1,3*}¹Department of Gynaecology and Obstetrics, Sir Run Run Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 211112;²Department of Gynaecology and Obstetrics, Nanjing Red Cross Hospital, Nanjing 210001; ³Department of

Gynaecology and Obstetrics, the Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210003;

⁴Department of Gynaecology and Obstetrics, the Fourth Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210031, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the association between vitamin D (VD) deficiency and the pathogenesis of polycystic ovarian syndrome (PCOS). **Methods:** Vitamin D levels were detected in 34 patients with PCOS and 30 healthy women, and the correlation analysis was performed. Vitamin D deficiency mouse model and PCOS mouse model were constructed and divided into four groups: control group (CTR group), PCOS group, vitamin D deficiency group (VD⁻ group), and vitamin D deficiency combined with PCOS group (VD⁻+PCOS group). Estrous cycle and ovary morphological changes were observed. Serum sex hormone indexes and glucose lipid metabolism indexes were detected. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was used to detect the mRNA levels of hormone synthase

[基金项目] 国家自然科学基金(81873820);南京市卫生科技发展专项资金项目(YKK19150)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: boqun_xu@njmu.edu.cn; chenyan6311@163.com

and sex hormone receptor in ovarian tissues. **Results:** The levels of serum 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] in PCOS women were significantly lower than those in normal healthy women [(16.49 ± 6.50) ng/mL vs. (20.08 ± 5.28) ng/mL, $P=0.019$]. The levels of luteinizing hormone (LH), testosterone (TT), LH/FSH ratio and free androgen index (FAI) in PCOS group were significantly higher than those in control group, while the levels of sex hormone binding globulin (SHBG) were significantly lower than those in control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Correlation analysis showed that serum 25(OH)D levels of the total sample population were negatively correlated with LH ($r=-0.271$, $P < 0.05$), LH/FSH ratio ($r=-0.314$, $P < 0.05$), TT ($r=-0.276$, $P < 0.05$), prolactin (PRL) ($r=-0.274$, $P < 0.05$) and FAI ($r=-0.312$, $P < 0.05$) respectively, and serum 25(OH)D levels in PCOS patients were negatively correlated with PRL ($r=-0.404$, $P < 0.05$). Vitamin D deficiency stalled the estrous cycle in mice. Compared with the CTR group, the serum LH levels of mice in other three groups were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the CTR group, the mRNA level of androgen receptor (AR) in ovarian tissues of mice in VD⁻ group was increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Vitamin D deficiency existed in patients with PCOS. There was a negative correlation between serum 25(OH)D and PRL in PCOS patients. Vitamin D deficiency disturbs normal estrous cycle and affects sex hormone levels in mice. Vitamin D deficiency may participate in the occurrence of PCOS by regulating the expression of sex hormone receptor.

[Key words] polycystic ovary syndrome; vitamin D; prolactin; estrous cycle; luteinizing hormone; androgen receptor

[J Nanjing Med Univ, 2023, 43(07):934-944]

多囊卵巢综合征(polycystic ovarian syndrome, PCOS)是最常见的影响育龄期女性的内分泌疾病之一,临床表现主要包括月经不调、排卵功能障碍及高雄激素血症等相关症状,严重影响了女性生殖生育功能^[1-2]。除此以外,这类患者常伴有其他系统疾病,包括糖脂代谢异常、慢性炎症、高血压等心血管疾病^[3]。PCOS目前病因仍不明确,可能是遗传、环境因素交互作用^[4-5],现有研究尚未能全面阐述其发病机制。

维生素D(vitamin D, VD)是一种类固醇激素,主要功能是调节骨骼生长发育和钙、磷代谢。近年来有临床研究发现,VD缺乏在PCOS患者中比较常见,与PCOS患者的卵泡发育障碍和代谢障碍等存在密切的关系,VD补充治疗后可以改善PCOS患者的胰岛素抵抗、脂代谢和激素水平^[6]。

为了探索VD缺乏和PCOS之间的关系,本研究比较了PCOS女性和正常健康女性血清中VD水平、性激素水平及糖脂代谢生物标志物的差异。此外,本研究构建了VD缺乏小鼠模型、PCOS小鼠模型及VD缺乏联合PCOS小鼠模型,观察VD缺乏在PCOS发病过程中是否发挥作用,进一步探索PCOS可能的发病机制,为PCOS的临床治疗提供思路。

1 材料和方法

1.1 材料

来曲唑(letrozole, LET)(江苏恒瑞医药股份有限公司,国药准字H19991001);标准饲料及VD缺乏饲料均由江苏南通特洛菲饲料公司提供;促卵泡刺

激素(follicular-stimulating hormone, FSH)、促黄体生成素(luteinizing hormone, LH)酶联免疫吸附(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(武汉云克隆);RNA提取试剂TRIzol、逆转录和PCR试剂盒(南京诺唯赞);苏木精染色液、甲苯胺蓝染液(北京索莱宝公司)。

1.2 方法

1.2.1 临床样本收集

本研究血清样本来自2020年7月—2022年3月于南京医科大学附属逸夫医院妇科就诊并诊断为PCOS的34例患者,对照组为同期妇科门诊体检的30例正常健康女性。收集两组一般信息,包括年龄、职业、文化程度、婚育史、月经史、既往史、家族史等,测量身高、体重、血压,并根据身高、体重计算各自的体重指数(body mass index, BMI)。本研究经南京医科大学附属逸夫医院伦理委员会批准(伦理编号:2021-SR-030)。

PCOS组纳入标准:年龄在20~40岁;符合PCOS诊断标准。PCOS诊断标准采用2003年欧洲人类生殖和胚胎与美国生殖医学学会(ESHRE/ASRM)鹿特丹专家会议推荐的标准:①稀发排卵或无排卵,临床表现为闭经、月经稀发、初潮2~3年不能建立规律月经以及基础体温呈单相;有时,月经规律者并非有排卵性月经;②高雄激素的临床表现和高雄激素血症临床表现,如痤疮、多毛,血清总睾酮、游离睾酮高于正常值;③卵巢多囊性改变,超声检查见一侧或双侧卵巢中直径2~9 mm的卵泡 ≥ 12 个和(或)卵巢体积 ≥ 10 cm³。符合上述3项中任何2项,

并排除其他可能引起高雄激素和排卵异常的疾病即可诊断PCOS。健康对照组纳入标准:①年龄20~40岁;②超声检查显示正常;③实验室三大常规检测显示正常。排除标准:①因其他疾病导致雄激素升高;②近3个月内服用过避孕药物、二甲双胍或其他影响激素代谢的药物;③处于妊娠期或哺乳期;④伴甲状腺功能、肝肾功能异常或高血压、糖尿病等慢性疾病需长期服药;⑤伴有卵巢其他相关性疾病;⑥恶性肿瘤;⑦近3个月内服用影响体内VD及钙、磷等微量元素代谢的药物。

1.2.2 实验室指标检查

在南京医科大学附属逸夫医院检验科收集患者检查后剩余的的血样,在中心实验室离心收集血清后送杭州佰辰医学检验所,质谱法检测PCOS组患者和对照组正常健康女性的血清25(OH)D水平,其余指标均在南京医科大学附属逸夫医院检验科检测。血样收集时间:月经期第2~5天,闭经或停经患者于首次就诊时,清晨空腹8 h后抽取静脉血。检测指标包括性激素组合:LH、FSH、雌二醇(estradiol, E2)、孕酮(progesterone, P)、睾酮(testosterone, TT)、性激素结合球蛋白(sex hormone binding globulin, SHBG)、泌乳素(prolactin, PRL);代谢指标:空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)、空腹胰岛素(fasting insulin, FINS)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、促甲状腺生成素(thyroid stimulating hormone, TSH)。由检测结果计算 LH/FSH 比值、游离雄激素指数(free androgen index, FAI) = $TT \times 100 / SHBG$, 采用稳态模型(homeostasis model assessment, HOMA)计算胰岛素抵抗指数(HOMA - insulin resistance, HOMA - IR) = $(FBG \times FINS) / 22.5$ 。

1.2.3 实验动物分组与模型建立

20只3周龄健康雌性C57BL/6小鼠SPF级购自南京医科大学实验动物中心[许可证编号SCKK(苏)2021-0001]。在温度25℃、湿度(50±5)%、光照/黑暗为12 h/12 h的环境中常规饲养,本实验方案经过南京医科大学实验动物福利伦理委员会审查批准(编号:IACUC-2007007)。小鼠适应性喂养1周后,随机分为正常对照组(control, CTR组)、PCOS组、VD缺乏组(VD⁻组)、VD缺乏联合PCOS组(VD⁻+PCOS组)(每组各5只),分别予标准饲料或

VD缺乏饲料、VD缺乏饲料喂养。饲料配制:标准饲料按AIN-93标准配方生产,含VD 1 000 U/kg体重,0.5%钙,0.3%磷;VD缺乏饲料:几乎不含VD,含2.0%钙,1.2%磷。

CTR组:饲喂符合美国AIN93标准的对照饲料,饲喂6周后每日上午予10 mL/(kg·d) 0.9% NaCl溶液灌胃,连续21 d后收样。

PCOS组:饲喂符合美国AIN93标准的对照饲料,饲喂6周后每日上午予来曲唑1 mg/(kg·d)溶于0.9% NaCl溶液中(Let-0.9%NaCl)灌胃,连续21 d后收样^[7]。

VD⁻组:饲喂VD缺乏饲料,饲喂6周后每日上午予10 mL/(kg·d) 0.9% NaCl溶液灌胃,连续21 d后收样。

VD⁻+PCOS组:饲喂VD缺乏饲料,饲喂6周后每日上午予1 mg/(kg·d) Let-0.9%NaCl溶液灌胃,连续21 d后收样。

喂养时需每隔1 d更换1次鼠粮和饮水。笼子上不应含有超过48 h的饲料,超期的鼠粮及时丢弃^[8-9]。

1.2.4 动情周期测定

在饲喂第6周、第9周起于每天上午09:00—10:00使用10~20 μL生理盐水对小鼠的阴道进行冲洗并收集阴道上皮细胞,共持续8 d。将阴道上皮细胞涂抹在防脱载玻片上用95%乙醇固定10 min,使用0.1%甲苯胺蓝染色3 min。待玻片自然风干后,使用普通光学显微镜进行读片。根据阴道上皮细胞种类(是否角质化)、白细胞占比(主要为淋巴细胞)评估小鼠所处的动情周期阶段。

1.2.5 苏木素-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色观察各组小鼠卵巢组织形态学变化

卵巢组织切片,于温箱中烘烤2 h,二甲苯脱蜡、梯度酒精水化、HE染色、中性树胶封片、晾干后在白光显微镜下观察各组卵巢组织形态并采集相应图像。

1.2.6 小鼠血清中25(OH)D、性激素及糖脂代谢指标检测

小鼠血清中25(OH)D水平由杭州佰辰医学检验所运用质谱法检测;小鼠血清TT、TC、TG、HDL-C、LDL-C均由北京北方生物技术研究所有限公司测定;血糖由血糖仪检测;ELISA法检测各组小鼠血清FSH、LH水平,按照ELISA检测试剂盒说明书操作步骤,使用酶标仪测量波长450 nm处各孔吸光度值,标准曲线下计算各样品含量。

1.2.7 实时定量聚合酶链反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)检测卵巢组织中与激素合成相关基因的mRNA水平

使用TRIzol试剂提取卵巢组织中总RNA,并进

行逆转录,用SYBR Green Realtime PCR试剂盒进行RT-qPCR检测组织中激素合成相关基因的mRNA水平,2^{-ΔΔCt}法计算相关检测基因mRNA相对表达水平。引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

| 基因名称 | 上游(5'→3') | 下游(5'→3') |
|---------|-------------------------|-------------------------|
| β-actin | GGAAATCGTGCACATTAAG | CGGCAGTGGCCATCTCTT |
| STAR | AGCATGTTCTCGCTACGTT | ACCTCTCCCTGCTGGATGTA |
| CYP17A1 | GCTGCTTACCCTAGCTTATTGT | ACCGAATAGATGGGGCCATATTT |
| CYP19A1 | CGAAAGTGCTATCGTGG TT | TGTGGAAATCCTGCCGTCT |
| LHR | GACAACCTCCTCAATCTGGTCTG | AAAGCGTTCCCTGGTATGGTG |
| FSHR | GGCCATGCTCATCTTCACTG | ATAGAGGAAGGGGTTGGCAC |
| AR | TAGCCCCCTAT GGCTACACT | CATGGTCCCTGGTACTGTCC |
| CYP11A1 | TGCCTCCAGACTTCTTTCGAC | GCTTCTGCCTTAAGTCCCAGT |
| esr1 | GATGGTCAGTGCCTTGTGGGA | CCAGACGAGACCAATCATCAGA |

1.3 统计学方法

采用SPSS26.0进行统计学分析。服从正态分布的计量资料用均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本t检验,多组间数据比较采用Prism软件中单因素方差分析(one-way ANOVA)和Tukey's多重比较;不服从正态分布的计量资料用中位数(四分位数)[$M(P_{25}, P_{75})$]表示,用Mann-Whitney U检验进行比较。计数资料采用百分率(%)表示,组间比较采用卡方检验。VD与其他指标进行相关性分析,如数据服从正态分布用Pearson相关性

分析,非正态分布数据用Spearman相关性分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PCOS组与对照组一般资料及临床特征比较

两组基本情况,包括年龄、身高、体重、BMI的差异无统计学意义。性激素指标中,PCOS组LH、TT、LH/FSH、FAI水平明显高于对照组($P < 0.05$),SHBG水平明显低于对照组($P < 0.05$);甲状腺功能及糖脂代谢指标两组差异均无统计学意义(表2)。

表2 PCOS组与正常对照组临床特征比较

Table 2 Comparison of clinical characteristics between PCOS and normal control women

| 指标 | 对照组(n=30) | PCOS组(n=34) | P值 |
|---|-----------------------|-----------------------|---------|
| 一般情况 | | | |
| 年龄(岁, $\bar{x} \pm s$) | 28.10 ± 5.15 | 25.76 ± 4.88 | 0.067 |
| 身高(cm, $\bar{x} \pm s$) | 161.67 ± 4.65 | 162.62 ± 3.92 | 0.378 |
| 体重(kg, $\bar{x} \pm s$) | 55.47 ± 7.58 | 60.91 ± 15.25 | 0.072 |
| BMI(kg/m ² , $\bar{x} \pm s$) | 21.21 ± 2.73 | 22.95 ± 5.41 | 0.106 |
| 性激素 | | | |
| LH[mU/mL, $M(P_{25}, P_{75})$] | 5.03(3.83, 6.40) | 11.90(8.74, 18.36) | < 0.001 |
| FSH[mU/mL, $M(P_{25}, P_{75})$] | 5.55(4.50, 7.28) | 6.05(5.21, 6.79) | 0.904 |
| E2[pmol/L, $M(P_{25}, P_{75})$] | 122.50(86.51, 163.50) | 143.50(95.25, 204.50) | 0.247 |
| P[nmol/L, $M(P_{25}, P_{75})$] | 1.26(0.99, 1.60) | 1.20(0.79, 1.67) | 0.647 |
| TT(nmol/L, $\bar{x} \pm s$) | 0.82 ± 0.36 | 1.69 ± 0.815 | < 0.001 |
| SHBG(nmol/L, $\bar{x} \pm s$) | 67.90 ± 30.63 | 37.28 ± 20.09 | < 0.001 |
| PRL(ng/mL, $\bar{x} \pm s$) | 13.63 ± 4.61 | 15.16 ± 8.34 | 0.360 |
| LH/FSH($\bar{x} \pm s$) | 0.93 ± 0.32 | 2.55 ± 1.16 | < 0.001 |
| FAI[$M(P_{25}, P_{75})$] | 1.11(0.77, 1.69) | 5.04(3.08, 7.22) | < 0.001 |

(续表2)

| 指标 | 对照组(n=30) | PCOS组(n=34) | P值 |
|---|-------------------|---------------------|-------|
| 甲状腺功能 | | | |
| TSH($\mu\text{U/mL}$, $\bar{x} \pm s$) | 1.54 \pm 0.86 | 2.59 \pm 2.35 | 0.116 |
| 糖脂代谢指标 | | | |
| FBG(mmol/L , $\bar{x} \pm s$) | 4.95 \pm 0.06 | 4.83 \pm 0.07 | 0.194 |
| FINS[$\mu\text{U/L}$, $M(P_{25}, P_{75})$] | 7.75(6.17, 12.35) | 8.61(5.89, 15.08) | 0.247 |
| HOMA-IR[$M(P_{25}, P_{75})$] | 1.58(1.33, 2.80) | 1.61(1.20, 3.14) | 0.253 |
| TC[nmol/L , $M(P_{25}, P_{75})$] | 3.84(3.42, 4.52) | 48.48(42.00, 72.98) | 0.130 |
| TG[nmol/L , $M(P_{25}, P_{75})$] | 1.19(0.54, 1.28) | 1.49(1.23, 2.51) | 0.285 |
| LDL(nmol/L , $\bar{x} \pm s$) | 2.25 \pm 0.90 | 2.87 \pm 1.31 | 0.389 |
| HDL[nmol/L , $M(P_{25}, P_{75})$] | 1.22(1.13, 2.47) | 1.52(1.19, 1.74) | 0.616 |

2.2 两组患者血清25(OH)D水平和分布比较及其与各临床指标相关性分析

检测了34例PCOS患者和30例正常健康女性体内血清25(OH)D水平。PCOS女性血清中25(OH)D水平显著低于正常对照组女性[(16.49 \pm 6.50)ng/mL vs. (20.08 \pm 5.28)ng/mL, $t=2.405$, $P < 0.05$, 图1A]。按照VD缺乏的诊断标准, 25(OH)D ≤ 20 ng/mL

为VD缺乏, 将两组患者按照上述标准分为VD缺乏组和非缺乏组, PCOS组VD缺乏率显著增高($\chi^2=6.040$, $P < 0.05$, 图1B)。在总样本人群中, 血清25(OH)D水平与LH、LH/FSH比值、TT、PRL、FAI存在负相关, 差异具有统计学意义($P < 0.05$, 图1C~G)。PCOS患者血清25(OH)D水平与PRL存在负相关, 差异具有统计学意义($P < 0.05$, 图1H)。

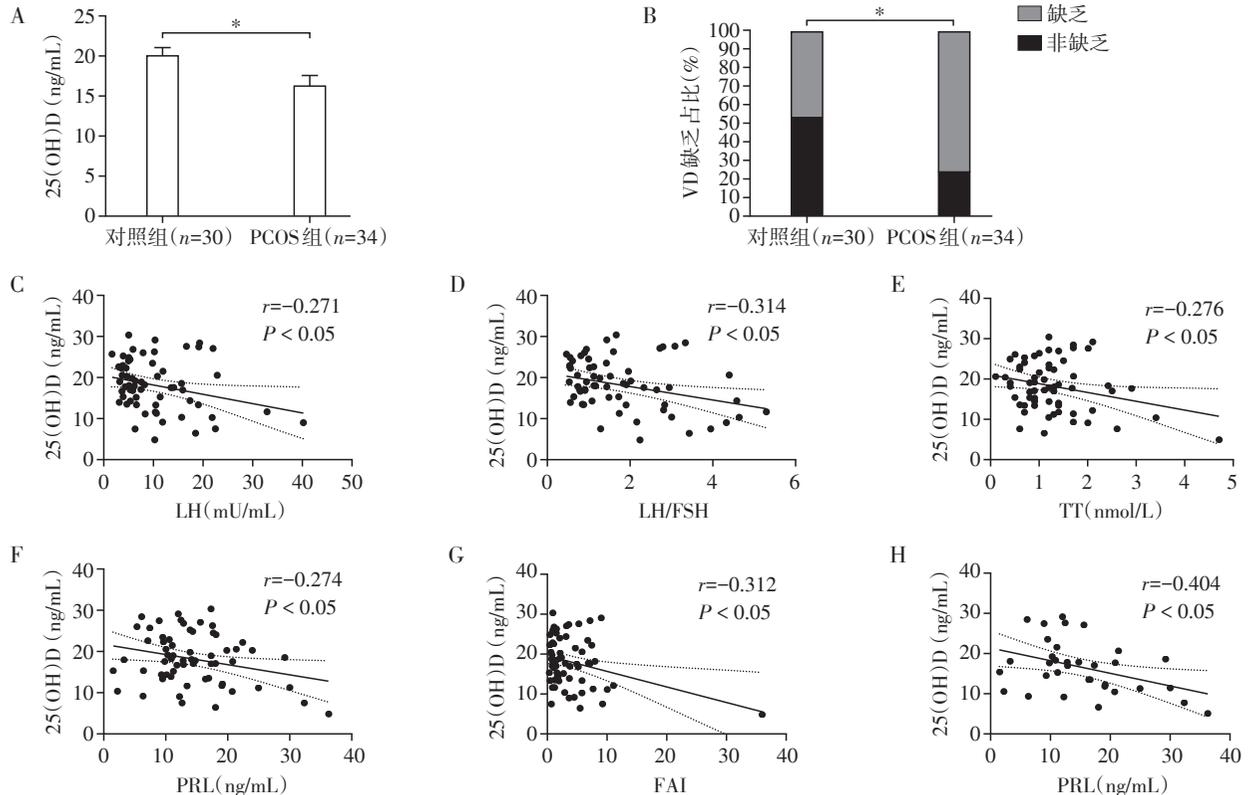


图1 PCOS组与正常对照组血清25(OH)D水平及临床特征相关性分析
A: 两组患者血清25(OH)D水平比较; B: 两组患者VD缺乏占比比较; C: 总样本人群血清中25(OH)D水平与LH的相关性分析; D: 总样本人群血清中25(OH)D水平与LH/FSH比值的相关性分析; E: 总样本人群血清中25(OH)D水平与TT的相关性分析; F: 总样本人群血清中25(OH)D水平与PRL的相关性分析; G: 总样本人群血清中25(OH)D水平与FAI的相关性分析; H: PCOS组患者血清中25(OH)D水平与PRL的相关性分析。两组比较, $P < 0.05$ 。

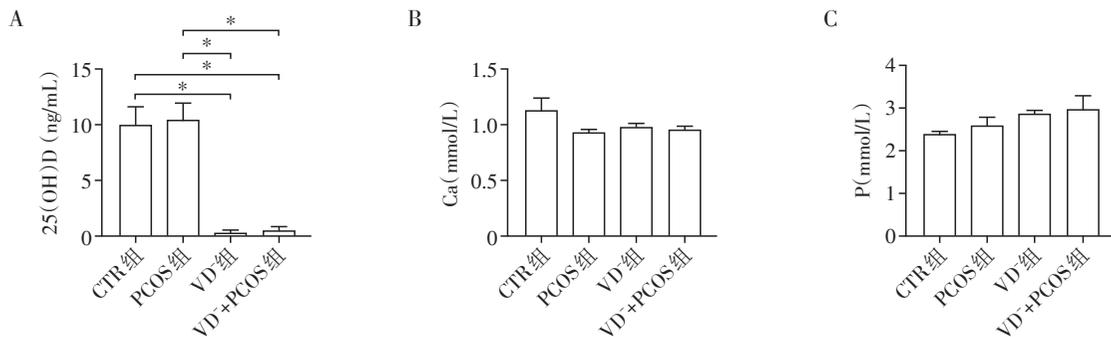
图1 PCOS组与正常对照组血清25(OH)D水平及临床特征相关性分析

Figure 1 Correlation analysis of serum 25(OH)D levels and clinical features in PCOS group and normal control group

2.3 VD缺乏小鼠模型鉴定

为了进一步探索VD缺乏和PCOS发病机制之间的关系,我们通过饲喂VD缺乏饲料构建VD缺乏小鼠模型。为了排除血钙、血磷对骨质影响的混杂因素,定制的特殊饲料不影响血钙、血磷水

平。如图2A所示,VD⁻组和VD⁻+PCOS组小鼠血清中的25(OH)D的水平明显低于CTR组和PCOS组小鼠($P < 0.05$),各组之间的血钙和血磷浓度差异无统计学意义(图2B、C),VD缺乏小鼠模型构建成功。



A: 各组小鼠血清中25(OH)D水平比较;B: 各组小鼠血清中钙离子浓度比较;C: 各组小鼠血清中磷离子浓度比较。两组比较, $P < 0.05(n=5)$ 。

图2 VD缺乏小鼠模型鉴定

Figure 2 Identification of VD deficiency mouse model

2.4 各组小鼠动情周期及卵巢形态改变

喂养6周后(均未进行来曲唑灌胃处理),对各组小鼠进行动情周期监测(图3A),结果发现,VD缺乏饲料喂养小鼠出现了动情周期停滞现象(图3B),VD⁻+PCOS组小鼠动情间期占比高于PCOS组($P < 0.05$,图3C)。喂养8周后(来曲唑灌胃2周后),PCOS组和VD⁻+PCOS组小鼠出现动情周期停滞现象,主要停滞于动情间期,符合PCOS小鼠动情周期变化情况(图3D、E)。与CTR组比较,PCOS组和VD⁻+PCOS组小鼠卵巢组织内可见多个囊状扩张大卵泡,颗粒层减少,黄体数量明显减少,可见少许出血性囊肿(图3F)。

2.5 各组小鼠体重、性激素及糖脂代谢指标检测

与CTR组和VD⁻组相比,PCOS组和VD⁻+PCOS组小鼠于喂养10周后体重明显升高($P < 0.05$,图4A);与CTR组相比,其余各组小鼠血清LH水平明显增高($P < 0.05$),TT水平有升高趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$);与CTR组相比,PCOS组和VD⁻+PCOS组小鼠血清LH/FSH比值明显增高($P < 0.05$);各组小鼠血清中FSH水平及糖脂代谢指标未见明显差异($P > 0.05$,图4B~J)。

2.6 各组小鼠卵巢组织中激素合成酶及性激素受体mRNA水平表达

与CTR组相比,PCOS组小鼠卵巢中细胞色素P450家族17亚家族A成员1(cytochrome P450 family 17 subfamily A member 1, CYP17A1)和卵泡刺激素

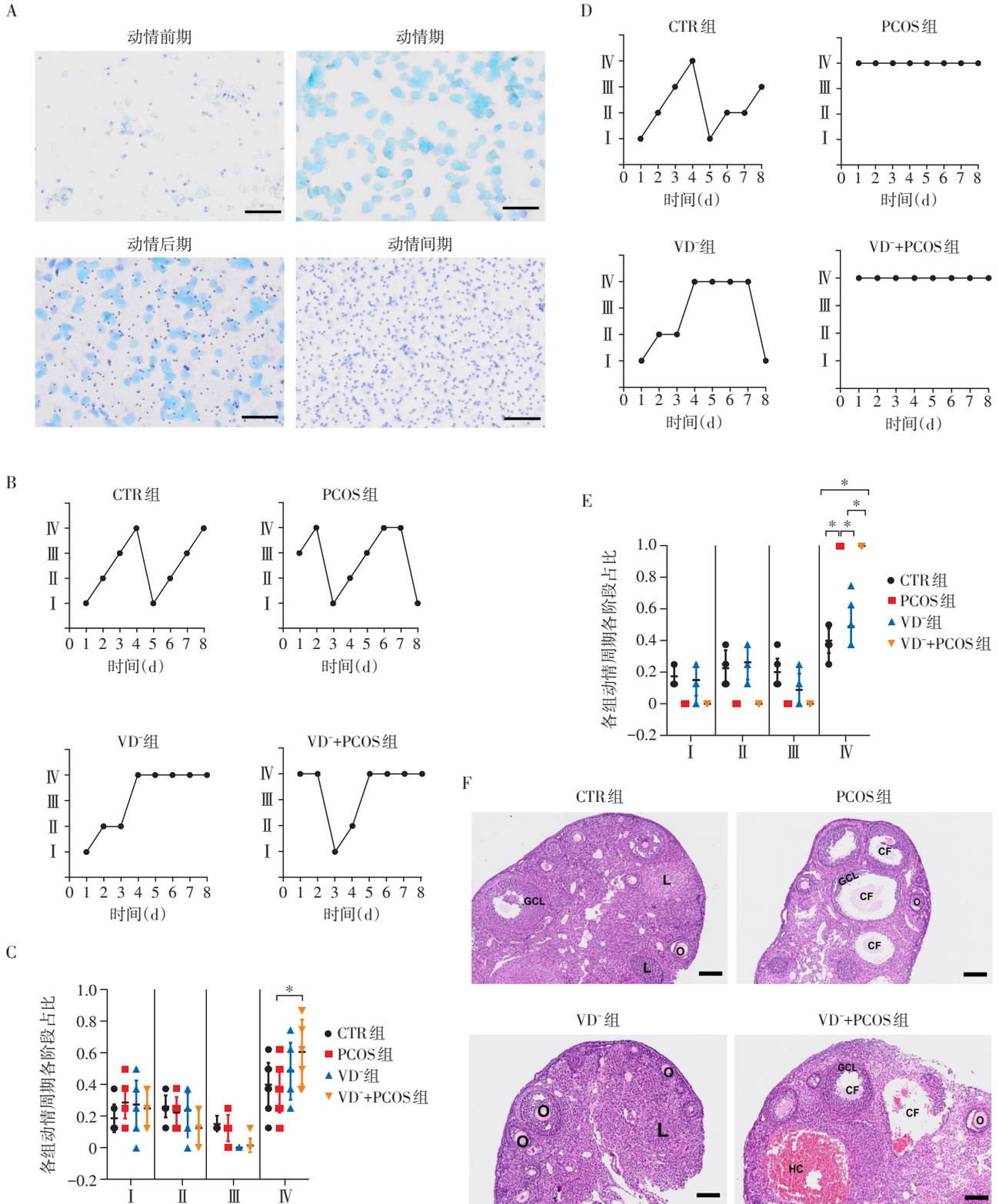
受体(follicular-stimulating hormone receptor, FSHR)mRNA表达明显上调($P < 0.05$),VD⁻组小鼠卵巢中雌激素受体(estrogen receptor, esr1)和雄激素受体(androgen receptor, AR)mRNA表达明显上调($P < 0.05$,图5)。

3 讨论

PCOS是一种妇科常见的内分泌代谢紊乱性疾病,临床上主要以少排卵或无排卵、雄激素分泌过多、卵巢多囊样改变、胰岛素抵抗等为特点,其发病具有高度异质性,但是目前发病机制尚不明确。

研究发现,PCOS患者普遍存在VD缺乏现象^[10]。多项研究表明,VD缺乏与PCOS的一些临床症状包括高雄激素血症、胰岛素抵抗等存在相关性^[11-12],我们推测VD与PCOS发病可能存在一定关系,但目前关于探索VD缺乏与PCOS发病机制之间关联的研究仍然较少。

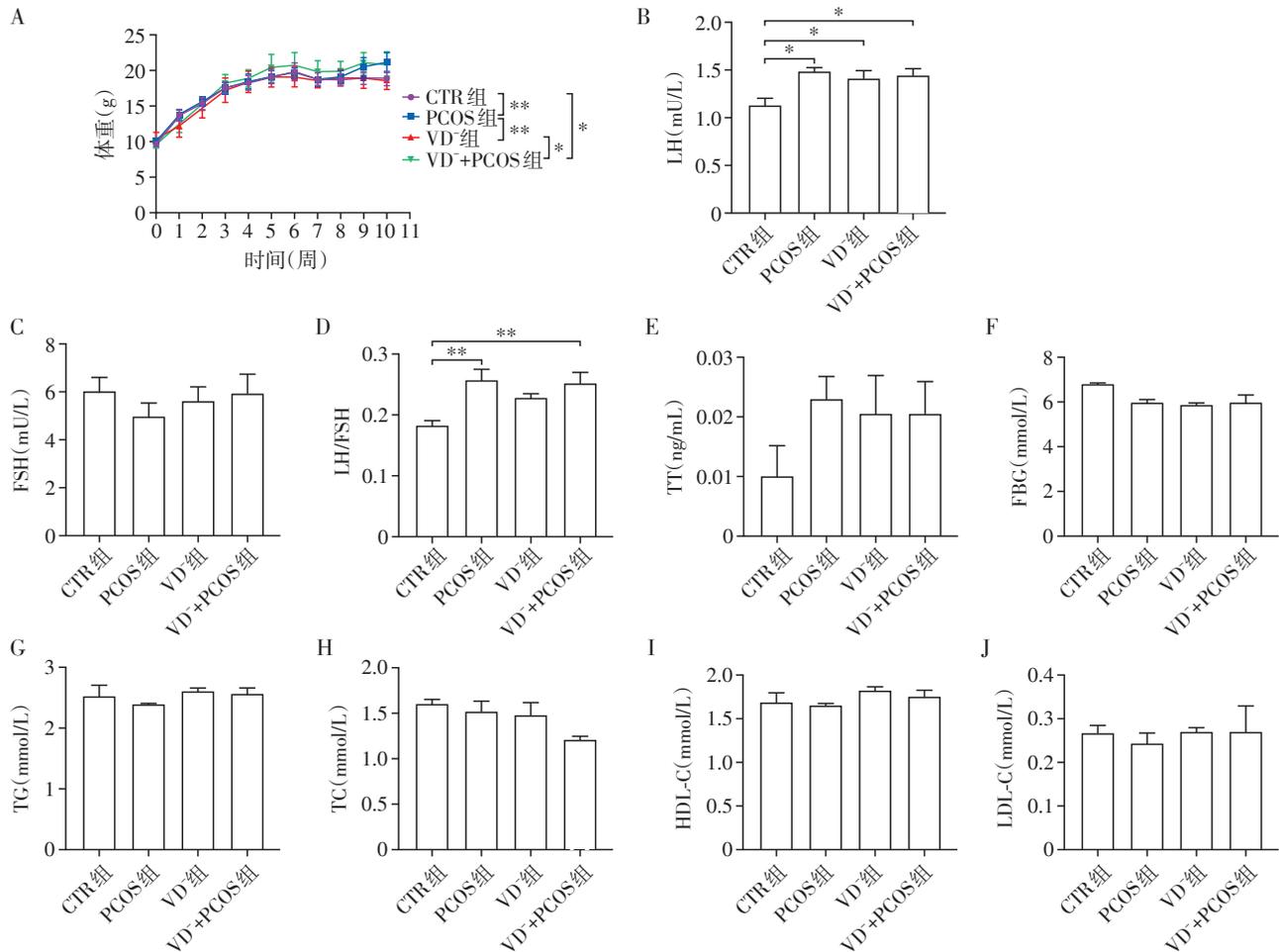
本研究结果显示,PCOS组血清LH、TT、LH/FSH、FAI均高于对照组,SHBG水平低于对照组,这符合PCOS患者体内性激素紊乱特征^[13-15],表明本次选取的实验对象具有典型性。本研究发现PCOS组血清25(OH)D水平明显低于对照组,与之前的多项临床研究结果一致^[16-18],表明PCOS患者普遍存在不同程度的VD缺乏。相关性检验结果显示,总样本人群中血清25(OH)D水平与LH、TT、LH/FSH、FAI呈明显的负相关。由此可见,血清25(OH)D水平与性激



A: 小鼠动情周期各阶段阴道涂片(甲苯胺蓝染色, ×100); B: 饲料喂养6周后各组小鼠动情周期变化, I: 动情前期; II: 动情期; III: 动情后期; IV: 动情间期; C: 饲料喂养6周后各组小鼠动情周期各阶段占比比较; D: 饲料喂养8周后各组小鼠动情周期变化; E: 饲料喂养8周后各组小鼠动情周期各阶段占比比较; F: 各组小鼠卵巢组织形态(HE, ×100); 颗粒细胞层(granular cell layer, GCL); 卵母细胞(oocyte, O); 囊状卵泡(cystic follicles, CF); 黄体(luteum, L); 出血性囊肿(hemorrhagic cyst, HC)。两组比较, * $P < 0.05$ ($n=5$)。

图3 各组小鼠动情周期检测及卵巢形态变化

Figure 3 Estrous cycle detection and ovary morphological changes in each group



A: 各组小鼠体重变化;B~E: 各组小鼠性激素指标 LH(B)、FSH(C)、LH/FSH(D)、TT(E)水平比较;F~K: 各组小鼠糖脂代谢指标 FBG(F)、TG(G)、TC(H)、HDL-C(I)、LDL-C(J)比较。两组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ ($n=5$)。

图4 各组小鼠体重、性激素及糖脂代谢指标检测

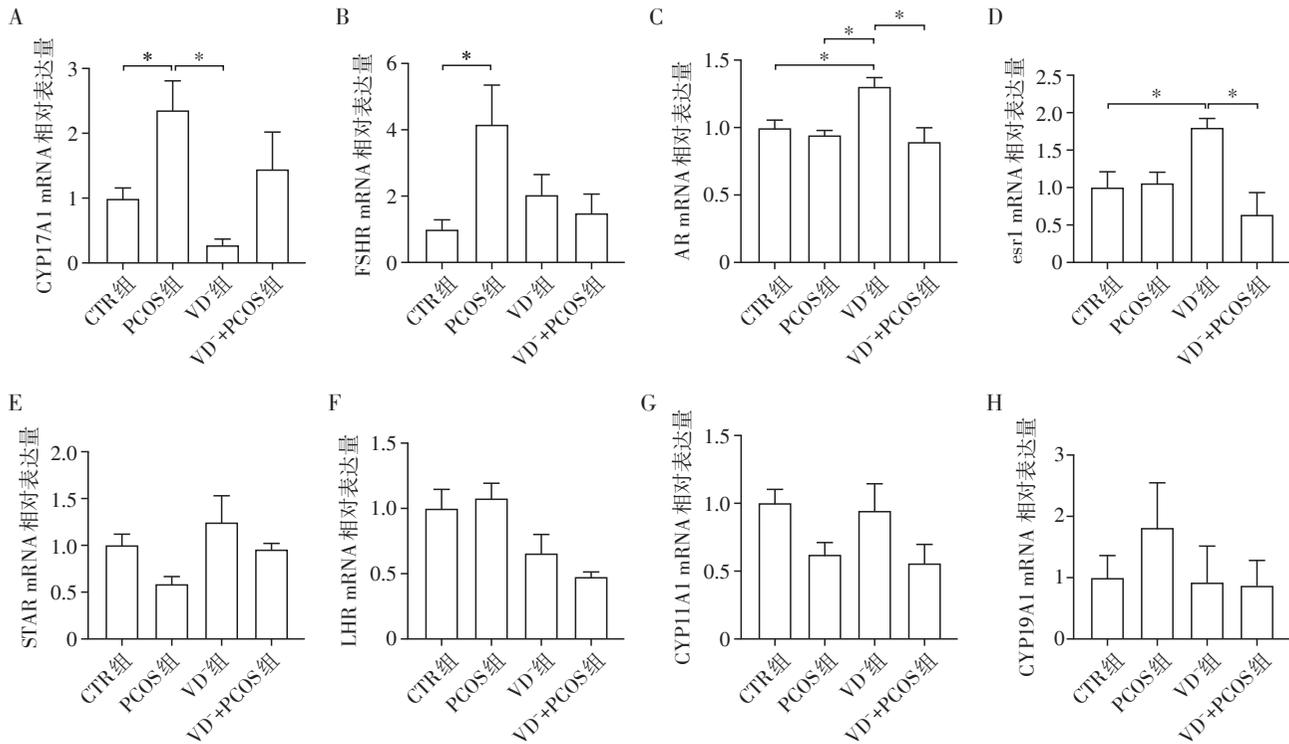
Figure 4 Detection of body mass,sex hormone and glucose and lipid metabolism indexes of mice in each group were detected

素代谢异常联系密切。近年来研究发现VD可能会影响卵巢芳香化酶^[19]和类固醇合成酶如3 β -羟基类固醇激素脱氢酶和类固醇合成快速调节因子^[20]的表达和活性,从而参与调节性激素的生物合成过程,具体机制仍待进一步研究。

此外,本研究发现总样本人群和PCOS组血清25(OH)D水平均与PRL呈明显的负相关。PRL是垂体及垂体外细胞分泌的神经肽激素,PRL的产生受促甲状腺激素释放激素、雌激素和多巴胺受体拮抗剂的刺激。各种病理、生理和遗传条件都会影响泌乳素细胞,使其PRL分泌增加,从而导致高泌乳素血症^[21]。正常水平的PRL具有促进乳腺发育生长,刺激并维持泌乳,刺激LH受体生成等作用。PCOS患者机体代谢紊乱,导致脑垂体前叶大量分泌PRL,对促性腺激素释放激素的脉冲释放起到抑制作用,并有效阻碍下丘脑-垂体-卵巢轴相关激素

的释放,从而导致体内雌激素及睾酮分泌不足,进而引发排卵功能障碍。以往已有多项研究报道PCOS患者PRL水平明显高于非PCOS患者^[21-23],可作为PCOS诊断的重要参考指标。本研究发现PCOS患者血清25(OH)D水平与PRL呈负相关,提示应加强对PCOS患者VD水平的检测从而进一步辅助诊断PCOS。目前关于PRL与VD之间相互作用的研究报道比较少见,需要通过进一步的相关研究来探索。

基于上述临床研究发现,为了探究体内VD缺乏与PCOS发病机制之间的关系,通过饲喂VD缺乏饲料成功构建了VD缺乏小鼠模型。此外,通过来曲唑灌胃法构建PCOS小鼠模型来进行研究。芳香化酶是卵巢中雄激素向雌激素转化的最后一步限速酶,来曲唑为芳香化酶抑制剂,通过抑制芳香化酶的生物学作用抑制雄激素向雌激素转化,导致体



A: CYP17A1 mRNA水平; B: FSHR mRNA水平; C: AR mRNA水平; D: esr1 mRNA水平; E: 类固醇激素合成急性调节蛋白(steroidogenic acute regulatory protein, STAR)mRNA水平; F: 促黄体生成素受体(luteinizing hormone receptor, LHR)mRNA水平; G: 细胞色素P450家族11亚家族A成员1(cytochrome P450 family 11 subfamily A member 1, CYP11A1)mRNA水平; H: 细胞色素P450家族19亚家族A成员1(cytochrome P450 family 19 subfamily A member 1, CYP19A1)mRNA水平。两组比较, $P < 0.05$ ($n=5$)。

图5 各组小鼠卵巢组织中激素合成酶及性激素受体表达水平的RT-qPCR分析

Figure 5 RT-qPCR analysis of expression levels of hormone synthetase and sex hormone receptor in ovarian tissue of mice in each group

内雄激素水平升高从而可引发PCOS^[24]。来曲唑灌胃法构建的PCOS小鼠模型表现出更明显的持续无排卵现象且小鼠在体重、卵巢体积和相对质量上明显增加^[25],与人体PCOS病理特征更为接近,是更成功的动物模型。本研究发现来曲唑灌胃处理小鼠动情周期停滞,血清中LH水平升高,LH/FSH比值升高,血清TT水平升高。卵巢HE染色可见多个囊状扩张大卵泡,颗粒层减少和黄体数量明显减少,符合PCOS的病理生理特征,提示PCOS小鼠模型构建有效。

PCOS小鼠模型的主要特征之一为动情周期的停滞和异常^[26]。本研究发现VD缺乏饲料喂养7周后小鼠已经出现动情周期停滞现象,主要停滞在动情间期。动情周期是有胎盘类哺乳动物的一种常见的生理变化,是受身体性腺轴释放的性激素影响而产生的周期性变化^[27]。因此,我们推测VD缺乏影响小鼠动情周期可能是通过影响体内性激素水平变化来参与PCOS发病过程。

在PCOS患者体内LH水平异常升高,FSH水平稍降低或正常导致LH/FSH比值增高,从而导致体内雄激素合成增多。另外,由于PCOS患者体内持续高LH水平使得卵泡募集数量较多,卵泡的选择和优势化停止,造成多个发育不全小卵泡停留在各阶段或者提前闭锁形成多囊卵巢形态^[28]。本研究发现,与CTR组相比,VD组小鼠血清中LH水平明显增加,LH/FSH比值和睾酮水平也有升高的趋势,这提示VD缺乏能够使LH水平升高从而参与PCOS的发生发展。但VD组小鼠卵巢形态与CTR组相比未见明显改变,这可能与小鼠造模方法和时间有关。

另外,有研究认为PCOS患者体内LH水平异常增高可能与下丘脑促性腺激素释放激素(GnRH)脉冲频率和幅度增加相关^[29]。我们推测VD缺乏可能会影响性激素分泌的中枢机制,导致性腺轴功能失调。

卵巢中类固醇激素的合成需要依赖许多不同

基因的正确表达,既往已有研究报道PCOS小鼠卵巢中LHR和CYP17A1表达上调^[9],并且似乎与PCOS高雄激素血症相关^[30]。PCOS高雄激素血症与体内高浓度的睾酮及AR活性增强相关,有研究发现AR通过与新型结合体PGK1直接结合参与PCOS排卵功能障碍发生,并介导颗粒细胞增殖和凋亡,从而导致PCOS的发生^[31]。本研究发现,与CTR组相比,VD组小鼠卵巢中AR在mRNA水平上表达增加,因此推测VD缺乏可能通过上调AR的表达来参与PCOS的发生,深入探讨具体机制将是我们下一步工作的重点。

综上所述,PCOS女性存在VD缺乏现象,PCOS患者血清PRL与25(OH)D存在负相关关系。VD缺乏能影响小鼠动情周期,使小鼠血清中LH水平升高,卵巢中AR mRNA表达上调从而参与PCOS的发生。因此,本研究为VD缺乏与PCOS发病机制之间关联研究提供了新思路。但是本研究还存在一定局限性,如样本量不够大,未对PCOS各临床分型进行分析,今后将扩大样本量继续更深入研究。

[参考文献]

- [1] ESCOBAR-MORREALE H F. Polycystic ovary syndrome: definition, aetiology, diagnosis and treatment [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2018, 14(5): 270-284
- [2] JOHAM A E, NORMAN R J, STENER-VICTORIN E, et al. Polycystic ovary syndrome [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2022, 10(9): 668-680
- [3] STENER-VICTORIN E, DENG Q L. Epigenetic inheritance of polycystic ovary syndrome-challenges and opportunities for treatment [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2021, 17(9): 521-533
- [4] HOEGER K M, DOKRAS A, PILTONEN T. Update on PCOS: consequences, challenges, and guiding treatment [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2021, 106(3): e1071-e1083
- [5] DAPAS M, DUNAIF A. Deconstructing a syndrome: genomic insights into PCOS causal mechanisms and classification [J]. *Endocr Rev*, 2022, 43(6): 927-965
- [6] THOMSON R L, SPEDDING S, BRINKWORTH G D, et al. Seasonal effects on vitamin D status influence outcomes of lifestyle intervention in overweight and obese women with polycystic ovary syndrome [J]. *Fertil Steril*, 2013, 99(6): 1779-1785
- [7] ZHANG X, XIAO H, ZHANG X, et al. Decreased microRNA-125b-5p disrupts follicle steroidogenesis through targeting PAK3/ERK1/2 signalling in mouse preantral follicles [J]. *Metabolism*, 2020, 107: 154241
- [8] 袁昕. VD缺乏对雌性大鼠糖脂代谢及卵巢形态功能的影响[D]. 苏州:苏州大学, 2019
- [9] 席月. Wnt和TGF- β 信号通路在1,25(OH)₂D₃调控骨稳态中的作用及机制[D]. 杭州:浙江大学, 2020
- [10] JOHAM A E, TEDEE H J, CASSAR S, et al. Vitamin D in polycystic ovary syndrome: relationship to obesity and insulin resistance [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2016, 60(1): 110-118
- [11] VELIJA-AŠIMI Z. Evaluation of the association of vitamin D deficiency with gonadotropins and sex hormone in obese and non-obese women with polycystic ovary syndrome [J]. *Med Glas (Zenica)*, 2014, 11(1): 170-176
- [12] WEHR E, PIEBER T R, OBERMAYER-PIETSCH B. Effect of vitamin D₃ treatment on glucose metabolism and menstrual frequency in polycystic ovary syndrome women: a pilot study [J]. *J Endocrinol Invest*, 2011, 34(10): 757-763
- [13] FU C, MINJIE C, WEICHUN Z, et al. Efficacy of sex hormone-binding globulin on predicting metabolic syndrome in newly diagnosed and untreated patients with polycystic ovary syndrome [J]. *Hormones (Athens)*, 2020, 19(3): 439-445
- [14] SIMONS P I H G, OLIVIER V, BONS J A P, et al. The relationships of sex hormone-binding globulin, total testosterone, androstenedione and free testosterone with metabolic and reproductive features of polycystic ovary syndrome [J]. *Endocrinol Diabetes Metab*, 2021, 4(3): e00267
- [15] ZENG X, XIE Y J, LIU Y T, et al. Polycystic ovarian syndrome: correlation between hyperandrogenism, insulin resistance and obesity [J]. *Clin Chimica Acta*, 2020, 502: 214-221
- [16] MU Y, CHENG D, YIN T L, et al. Vitamin D and polycystic ovary syndrome: a narrative review [J]. *Reprod Sci*, 2021, 28(8): 2110-2117
- [17] VÁRBÍRÓ S, TAKÁCS I, TÛŰŰ L, et al. Effects of vitamin D on fertility, pregnancy and polycystic ovary syndrome-a review [J]. *Nutrients*, 2022, 14(8): 1649
- [18] 成娟. 血清VD水平与PCOS患者胰岛素抵抗、骨代谢的相关性分析[J]. *中国医学工程*, 2022, 30(2): 40-43
- [19] LI H W R, BRERETON R E, ANDERSON R A, et al. Vitamin D deficiency is common and associated with metabolic risk factors in patients with polycystic ovary syndrome [J]. *Metab Clin Exp*, 2011, 60(10): 1475-1481
- [20] YAO X L, ZHANG G M, GUO Y X, et al. Vitamin D receptor expression and potential role of vitamin D on cell proliferation and steroidogenesis in goat ovarian granulosa cells [J]. *Theriogenology*, 2017, 102: 162-173

[21] SAEI GHARE NAZ M, MOUSAVI M, MAHBOOBIFARD F, et al. A meta-analysis of observational studies on prolactin levels in women with polycystic ovary syndrome [J]. *Diagnostics*, 2022, 12(12):2924

[22] 林秋平, 欧德贵, 陈建莹. 血清 AMH、CA125、PRL 在多囊卵巢综合征中的应用[J]. *中国卫生标准管理*, 2022, 13(7):69-72

[23] MAHBOOBIFARD F, RAHMATI M, AMIRI M, et al. To what extent does polycystic ovary syndrome influence the cut-off value of prolactin? Findings of a community-based study [J]. *Adv Med Sci*, 2022, 67(1):79-86

[24] CORRIE L, GULATI M, SINGH S K, et al. Recent updates on animal models for understanding the etiopathogenesis of polycystic ovarian syndrome [J]. *Life Sci*, 2021, 280:119753

[25] 刘艳丽. 来曲唑法和脱氢表雄酮法诱导 PCOS 大鼠模型 的比较研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2011

[26] DI EMIDIO G, REA F, PLACIDI M, et al. Regulatory functions of L-carnitine, acetyl-, and propionyl L-carnitine in a PCOS mouse model: focus on antioxidant/antiglycative molecular pathways in the ovarian microenvironment [J]. *Antioxidants(Basel)*, 2020, 9(9):867

[27] 李合, 王人卫, 赵璨, 等. 补充低聚糖对运动诱导的动情周期抑制大鼠 HPO 轴激素的影响[J]. *上海体育学院学报*, 2018, 42(4):105-110

[28] 何淑莹, 申玉华, 尤昭玲. 多囊卵巢综合征 LH 及 FSH 的研究现状[J]. *中医药导报*, 2005, 11(8):82-84

[29] BALEN A H. Hypersecretion of luteinizing hormone and the polycystic ovary syndrome [J]. *Hum Reprod Oxf Engl*, 1993, 8(Suppl 2):123-128

[30] NIMZ M, SPITSCHAK M, FÜRBASS R, et al. The pre-ovulatory luteinizing hormone surge is followed by down-regulation of CYP19A1, HSD3B1, and CYP17A1 and chromatin condensation of the corresponding promoters in bovine follicles [J]. *Mol Reprod Dev*, 2010, 77(12):1040-1048

[31] LIU X, SUN C, ZOU K, et al. Novel PGK1 determines SKP2-dependent AR stability and reprograms granular cell glucose metabolism facilitating ovulation dysfunction [J]. *EBioMedicine*, 2020, 61:103058

[收稿日期] 2023-01-12
(责任编辑: 蒋莉)

(上接第 926 页)

ganglioside biosynthesis genetic polymorphism in cervical cancer development [J]. *J Obstet Gynaecol*, 2020, 40(8):1127-1132

[26] JIANG J H, GU J X. Beta1, 4-galactosyltransferase V a growth regulator in glioma [J]. *Methods Enzymol*, 2010, 479:3-23

[27] YANG Y F, JIANG D G, ZHOU Z Y, et al. CDK7 blockade suppresses super-enhancer-associated oncogenes in bladder cancer [J]. *Cell Oncol Dordrecht*, 2021, 44(4):871-887

[28] WU Y W, ZHAO B, CHEN X H, et al. Circ_0009910 sponges miR-491-5p to promote acute myeloid leukemia progression through modulating B4GALT5 expression and PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Int J Lab Hematol*, 2022, 44(2):320-332

[29] LIN R, YANG Y, WU E, et al. SIRT2 promotes cell proliferation and migration through mediating ERK1/2 activation and lactosylceramide accumulation in prostate cancer [J]. *Prostate*, 2023, 83(1):71-81

[收稿日期] 2023-04-10
(责任编辑: 蒋莉)