

雄激素对颗粒细胞乳酸生成的抑制作用

朱青,刁飞扬,马翔,高超,高莉,崔毓桂,刘嘉茵*

南京医科大学第一附属医院生殖医学科,生殖医学国家重点实验室,江苏 南京 210029

[摘要] 目的:观察雄激素对卵巢颗粒细胞乳酸生成的抑制作用,探讨多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)高雄激素状态下的颗粒细胞乳酸生成及其对卵泡发育的影响。方法:体外培养人卵巢癌颗粒细胞系KGN细胞,用不同浓度睾酮(0.1~1 000 nmol/L)处理不同时间(0~48 h)。测定培养上清液中乳酸含量,采用实时聚合酶链反应(real-time PCR)以及蛋白质印迹法(Western blot)分别检测细胞内乳酸脱氢酶A(LDHA)和乳酸脱氢酶B(LDHB)的mRNA及蛋白质表达水平。结果:人卵巢颗粒细胞系KGN细胞经1 000、100、1 nmol/L睾酮处理24 h或者1、10 nmol/L睾酮处理24及36 h后,其乳酸生成量显著减少($P < 0.05$)。并且,在100、1 nmol/L睾酮处理24 h后,KGN细胞内LDHA、LDHB的mRNA及蛋白质表达水平显著降低($P < 0.05$)。结论:较高浓度雄激素通过抑制卵巢颗粒细胞内LDHA、LDHB的表达从而降低乳酸生成,可能与PCOS卵泡发育障碍相关。

[关键词] 多囊卵巢综合征;高雄激素;颗粒细胞;乳酸;乳酸脱氢酶

[中图分类号] R71

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)07-962-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20180717

Excess androgen inhibiting lactate production in granulosa cells

Zhu Qing, Diao Feiyang, Ma Xiang, Gao Chao, Gao Li, Cui Yugui, Liu Jiayin*

Clinical Center of Reproductive Medicine, the First Affiliated Hospital of NMU, State Key Laboratory of Reproductive Medicine, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** To observe the negative effect of androgen on lactate production in human granulosa cells, meanwhile, to explore the follicular dysplasia in polycystic ovary syndrome (PCOS) with hyperandrogenism influenced by the reduced lactate. **Methods:** The human granulosa cell line-KGN cells were cultured *in vitro* and treated with different concentrations of testosterone (10^{-10} – 10^{-6} mol/L) for different time (0~48 h). The content of lactate in culture supernatant was measured. The mRNA levels of LDHA and LDHB were quantified by real-time PCR. The protein expression of LDHA and LDHB were detected by Western blot. **Results:** After treated with 10^{-6} , 10^{-7} and 10^{-9} mol/L testosterone for 24 h, besides, 10^{-8} and 10^{-9} mol/L testosterone for 24 h or 36 h, the contents of lactate in the supernatant were significantly decreased ($P < 0.05$). The mRNA and protein expression level of LDHA and LDHB significantly decreased after treated with 10^{-7} or 10^{-9} mol/L testosterone for 24 h ($P < 0.05$). **Conclusion:** Excess androgen can suppress the lactate production in human granulosa cell by inhibiting LDH, which may be related to follicular dysplasia in PCOS.

[Key words] PCOS; hyperandrogen; granulosa cell; lactate; lactate dehydrogenase

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(07):962-965, 1003]

多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)是生育年龄妇女最常见的内分泌紊乱疾病。在中国,PCOS的发病率为4.4%~7.3%^[1-2]。与正常

女性相比,PCOS患者卵泡液内乳酸、丙酮酸、丙氨酸和谷氨酰胺水平显著降低,糖蛋白、胆固醇、乙酸盐水平显著升高^[3]。PCOS患者卵泡液和血循环内雄激素水平普遍高于正常女性绝经前水平^[4-5];高雄激素可引起脂肪组织、胰岛B细胞及骨骼肌中的高胰岛素及胰岛素抵抗,导致能量代谢障碍^[6-8]。卵巢局部的葡萄糖代谢受损会降低颗粒细胞和卵母细胞的能量供应,诱发排卵障碍^[9]。那么,较高浓度的

[基金项目] 国家自然科学基金(81471429,81730041);国家重点研发计划(2016YFC1000703);江苏省卫生厅科教强卫工程

*通信作者(Corresponding author), E-mail: jyliu_nj@126.com

雄激素是否影响卵巢颗粒细胞的乳酸生成,进而影响卵泡发育,参与PCOS的发生发展?本研究采用不同浓度睾酮处理体外培养的人颗粒细胞系KGN细胞,观察颗粒细胞的乳酸合成,探讨卵巢局部高雄激素对颗粒细胞乳酸生成的影响,及其与PCOS发生发展的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

人卵巢癌颗粒细胞系KGN细胞由南京大学惠赠。睾酮(ACROS公司,美国),乳酸试剂盒(南京建成生物工程研究所),逆转录酶、SYBR-Green 探针(TaKaRa公司,日本),TRIzol试剂(Invitrogen公司,美国), β -actin抗体(sc-4778,Santa Cruz公司,美国),LDHA抗体(ab101562,Abcam公司,英国),LDHB抗体(ab53292,Abcam公司,英国),HRP标记的山羊抗兔、山羊抗鼠抗体(Jackson Immunoresearch公司,美国),DMEM/F12培养液、青霉素链霉素(Gibco公司,美国),胎牛血清(ScienCell公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 人卵巢癌颗粒细胞系KGN细胞体外培养

KGN细胞系源自侵袭性卵巢颗粒细胞癌患者(核型:45,XX,7q-, -22),KGN细胞以功能性卵泡刺激素(FSH)受体表达及较高活性芳香化酶为特征,被广泛应用于卵巢颗粒细胞中类固醇生成、颗粒细胞生长和凋亡调控机制等方面的研究^[10]。KGN细胞培养于含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素的DMEM/F12培养液中。

1.2.2 颗粒细胞乳酸含量测定

KGN细胞接种于6孔板内,待细胞融合至80%~90%时,分别用含0.1、1、100、1 000 nmol/L睾酮(乙醇溶解)的无血清DMEM/F12培养液处理KGN细胞24 h($n=4$);1、10 nmol/L睾酮处理KGN细胞0、12、36、48 h($n=4$),收集各组睾酮处理后的KGN细胞培养上清液,离心去除杂质。按乳酸测定试剂盒操作说明书:在上清液中加入酶工作液及显色剂后充分混匀,37 $^{\circ}$ C水浴10 min,加入反应终止液充分混匀后,用酶标仪测定波长530 nm时的吸光度值。

1.2.3 Real-time PCR法检测LDHA、LDHB的mRNA表达水平

乳酸脱氢酶(LDH)是一种糖酵解关键酶,能够将丙酮酸还原为乳酸。人LDH同工酶由3种不同的基因LDH-A、LDH-B和LDH-C编码;而LDH-C同工酶仅在睾丸和精子中表达。体外分别用1、100 nmol/L

睾酮培养KGN细胞24 h($n=3$)后,用TRIzol完全裂解细胞。将提取的RNA用逆转录酶合成cDNA后,通过SYBR-Green 探针来检测GAPDH、LDHA、LDHB的基因表达。引物序列采用Primer Premier 5.0软件设计,并通过Primer-BLAST检索确认引物的特异性,设计好基因引物由南京锐真生物技术有限公司合成(表1)。

表1 Real-time PCR引物序列及其产物长度

Table 1 Primers used for real-time polymerase chain reaction

基因	引物序列(5'~3')	产物长度(bp)
GAPDH	正向 AATCCCATCACCATCTTCC	309
	反向 GAGTCCTTCCACGATACCAA	
LDHA	正向 GTGCCTGTATGGAGTGG	151
	反向 TGTAGCCTTTGAGTTTGA	
LDHB	正向 GCTGGATTCGCTACCTT	166
	反向 CATTGTCAGTTCCATTTC	

1.2.4 Western blot法检测LDHA、LDHB的蛋白表达水平

KGN细胞于体外分别采用1或100 nmol/L睾酮培养24 h($n=3$)后,使用含蛋白酶和磷酸酶抑制剂的RIPA细胞裂解液充分裂解细胞,并吹打混匀,置冰上裂解30 min。12 000 r/min于4 $^{\circ}$ C离心30 min,取上清。测定蛋白浓度后配置成蛋白样本,70 $^{\circ}$ C加热10 min,将样本依序加入Bis-Tris预制胶孔内,180 V电泳30~50 min。用PVDF膜250 mA转印2 h,5%牛血清白蛋白(TBST溶液配制)于37 $^{\circ}$ C封闭1 h。分别加入 β -actin、LDHA和LDHB抗体,4 $^{\circ}$ C摇床过夜,加入HRP标记二抗37 $^{\circ}$ C孵育1 h。ECL化学发光法显色、曝光。

1.3 统计学方法

所有数据均重复3次以上。定量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用SPSS 20软件对数据进行统计学分析。多组间比较采用方差分析,两两比较采用LSD法, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度睾酮对KGN细胞乳酸生成的影响

体外培养人卵巢癌颗粒细胞系KGN细胞,待细胞生长至80%~90%融合时,换用含睾酮(1 000.0、100.0、1.0和0.1 nmol/L)的无血清培养液培养24 h,收集细胞培养上清液并检测乳酸含量。结果如图1所示:用浓度为1 000.0、100.0和1.0 nmol/L睾酮体

外培养KGN细胞24 h,上清液中乳酸含量较之睾酮0 nmol/L组降低($n=4, P < 0.05$)。细胞培养上清液中乳酸的降低程度与睾酮浓度呈剂量依赖关系。

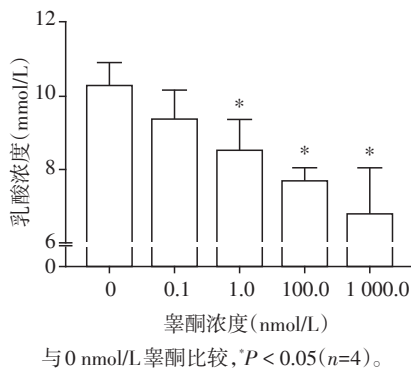


图1 不同浓度睾酮对KGN细胞乳酸生成的影响

Figure 1 Different concentrations of testosterone effected the lactate production in KGN cells

2.2 睾酮处理KGN细胞不同时间对其乳酸生成的影响

用10、1 nmol/L睾酮体外培养KGN细胞0~48 h后,测定上清液中乳酸含量。结果如图2所示:细胞上清液中乳酸含量自培养开始增加,24 h达到高峰,而后开始下降。10、1 nmol/L睾酮处理细胞24、36 h后,较之睾酮0 nmol/L组,乳酸含量均降低($n=4, P < 0.05$)。

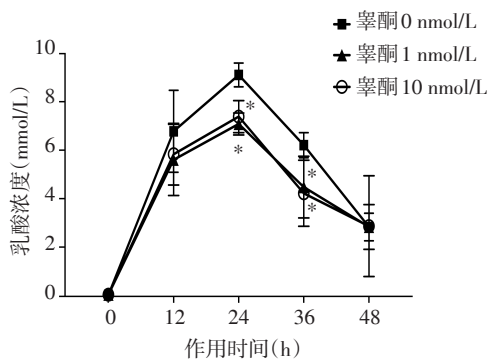


图2 睾酮处理不同时间对KGN细胞乳酸生成的影响

Figure 2 Testosterone affected the lactate production in KGN cells for different times

2.3 睾酮对KGN细胞内LDHA、LDHB的mRNA表达水平的影响

本研究用1、100 nmol/L睾酮处理KGN细胞24 h后,用real-time PCR检测LDHA、LDHB的表达水平。1、100 nmol/L睾酮显著抑制颗粒细胞内LDHA、LDHB的基因表达水平($n=3, P < 0.05$,图3)。

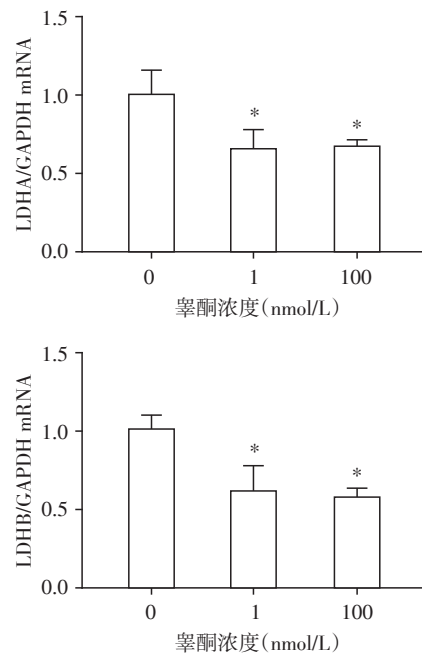


图3 睾酮抑制KGN细胞内LDHA、LDHB的mRNA水平
Figure 3 Testosterone decreased the mRNA levels of LDHA and LDHB in KGN cells

2.4 睾酮对KGN细胞内LDHA、LDHB的蛋白表达水平的影响

体外培养的KGN细胞经1和100 nmol/L睾酮处理24 h后,用Western blot检测细胞内LDHA、LDHB蛋白水平的表达。1和100 nmol/L睾酮处理24 h后,LDHA、LDHB的蛋白水平显著降低($P < 0.05$,图4)。

3 讨论

卵母细胞被多层卵丘颗粒细胞包围形成卵丘卵母复合物(COC)。卵母细胞和卵丘颗粒细胞经由缝隙连接的旁分泌和双向通信促使卵母细胞成熟(特别是核成熟)。葡萄糖是COC的关键代谢物,通过糖酵解、磷酸戊糖途径、己糖胺生物合成途径和多元醇途径进行代谢。在卵母细胞成熟过程中,卵丘颗粒细胞通过糖酵解途径代谢葡萄糖,为卵母细胞提供直接供能(三磷酸腺苷,ATP)以及容易利用的代谢物,如丙酮酸、乳酸^[9,11]。LDH可催化丙酮酸和乳酸的相互转化。卵丘颗粒细胞和卵母细胞分别高表达LDHA和LDHB。丙酮酸和乳酸一旦进入卵母细胞,便通过三羧酸循环和氧化磷酸化进行代谢,即卵母细胞内主要的ATP产生途径。在哺乳动物中,葡萄糖代谢和乳酸、丙酮酸在卵母细胞减数分裂、包膜下卵泡成熟及其受精后的早期胚胎发育中发挥重要作用^[12]。研究表明,在猪卵母细胞体外

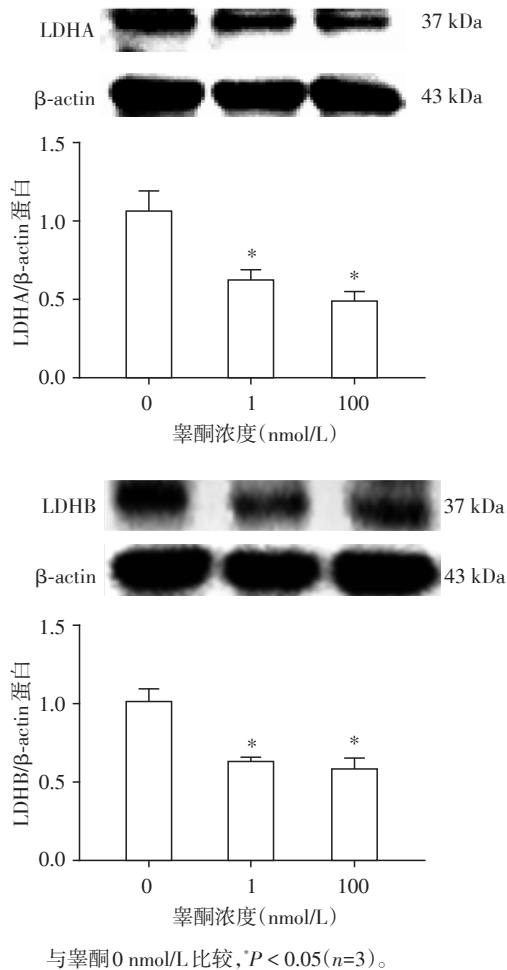


图4 睾酮降低KGN细胞内LDHA、LDHB的蛋白水平
Figure 4 Testosterone decreased the protein levels of LDHA and LDHB in KGN cells

成熟期间,通过添加药理学(氟化钠)或生理学(ATP)糖酵解抑制剂,使乳酸产生、葡萄糖摄取呈剂量依赖性方式下降,致使达到M II的卵母细胞百分比显著下降,而在猪卵母细胞的培养基中添加葡萄糖,则加速卵母细胞的减数分裂进程,并增加达到M II期卵母细胞百分比^[13]。

PCOS患者临床表现以无排卵、稀发排卵、高雄激素为特征。近期有研究表明:高雄激素诱导的胰岛素抵抗与线粒体功能障碍有关^[5,14]。卵丘颗粒细胞向卵母细胞提供乳酸/丙酮酸的驱动非常依赖于胰岛素对葡萄糖的摄取^[15]。线粒体在胰岛素靶组织的功能发挥及胰岛素释放两方面发挥重要作用。线粒体功能障碍(或线粒体密度降低)可能阻断胰岛素信号转导途径或产生过量活性氧(ROS)导致胰岛素抵抗^[16]。此外,卵丘-卵母细胞复合体的糖酵解还与卵母细胞氧化应激相关^[17]。有研究显示:PCOS患者线粒体功能发生障碍,其卵母细胞线粒体

生物发生、数量、形态和动力学存在缺陷^[16]。研究发现:经辅助生殖技术(ART)治疗的PCOS患者促排卵后卵泡液中乳酸水平较之正常组下降,卵母细胞质量差,导致周期取消率高、受精率低^[3]。因为卵巢位于盆腔,故难以直接测定PCOS患者不同发育水平卵泡的卵泡液中乳酸水平。本研究发现,体外培养的人颗粒细胞系KGN细胞,经睾酮处理后,颗粒细胞培养上清内乳酸含量减少,提示在较高浓度雄激素作用下,卵巢颗粒细胞的线粒体功能可能发生障碍,为卵母细胞发育所提供的乳酸相应减少。

PCOS患者高雄激素可能诱发卵泡液内糖酵解紊乱,丙酮酸和氨基酸代谢紊乱,进而发生卵泡发育障碍。本研究发现,较高雄激素对卵巢颗粒细胞的乳酸脱氢酶表达水平具有抑制作用,包括LDHA和LDHB。本文推论,PCOS患者卵巢局部高雄激素通过抑制了颗粒细胞的LDH表达,阻断糖酵解途径,减少乳酸生成;颗粒细胞的乳酸生成减少致使卵母细胞供能不足,卵泡成熟功能缺陷。本研究也提示,在临床PCOS患者的卵泡体外成熟过程中,可尝试在培养液内适量添加乳酸或糖酵解刺激物以提高卵泡成熟率,因而具有潜在的研究与应用价值。

【参考文献】

- [1] Boyle JA, Teede HJ. PCOS: Refining diagnostic features in PCOS to optimize health outcomes [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2016, 12(11):630-631
- [2] Ding T, Hardiman PJ, Petersen I, et al. The prevalence of polycystic ovary syndrome in reproductive aged women of different ethnicity: a systematic review and meta-analysis [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(56):96351-96358
- [3] Zhang Y, Liu L, Yin TL, et al. Follicular metabolic changes and effects on oocyte quality in polycystic ovary syndrome patients [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(46):80472-80480
- [4] Escobar-Morreale HF. The role of androgen excess in metabolic dysfunction in women: androgen excess and female metabolic dysfunction [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 1043:597-608
- [5] Mishra JS, More AS, Kumar S. Elevated androgen levels induce hyperinsulinemia through increase in Ins1 transcription in pancreatic beta cells in female rats [J]. *Biol Reprod*, 2018, 98(4):520-531
- [6] Rosenfield RL, Ehrmann DA. The pathogenesis of polycystic ovary syndrome (PCOS) [J]. *Endocr Rev*, 2016, 37(5):467-520
- [7] Yang F, Ruan YC, Yang YJ, et al. Follicular hyperan-

(下转第1003页)

视的是,自动化仪器检测红细胞时存在大量的干扰因素,如结晶、真菌、细菌等,且不能识别异常红细胞,如影红细胞、针尖样小红细胞、多芽孢红细胞等,其给出的红细胞数据的准确性欠佳。本研究中的红细胞识别工作由人工完成,即使是镜下血尿标本也可采集红细胞数据,敏感性为92.2%,特异性为87.5%。同时不受尿液样本中其他杂质的干扰,对非正常形态的红细胞不会发生漏检,从而保证了本方法中红细胞参数具有较好的准确性和可靠性。

如何既客观又准确地判断尿液中红细胞的形态学是临床检验工作中的难点。本实验通过对肾源性和非肾源性血尿患者的回顾性分析,以红细胞形态学为基础,运用图像分析技术,统计出了不同疾病状态下红细胞的特征性数据信息。尿红细胞形态学参数图像分析法,综合主观和客观相结合的方式,是一种简便、快捷和准确的检测方法,可初步辅助鉴别诊断肾源性血尿和非肾源性血尿。

【参考文献】

[1] 刘凤奎,陈海平.血尿临床诊断思路[J].中国临床医生杂志,2016,44(2):22-25

[2] 谭同均,邓树琴,彭宇生,等.三种尿红细胞检测方法在肾性血尿诊断中的临床应用评价[J].吉林医学,2012,33(25):5421-5424

[3] 黄莉,陈继荣,温俊乐,等.评价鉴别血尿来源的三种方法的应用价值[J].贵阳医学院学报,2014,39(4):584-586

[4] 杨麦贵,杨铮,杨阳.三种方法检查判断血尿来源的比较研究[J].中国实验诊断学,2016,20(6):963-965

[5] Fogazzi GB, Garigali G. The clinical art and science of urine microscopy [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2003,12(6):625-632

[6] 范金斌.血尿红细胞形态及其分类在临床应用中的价值[J].实验与检验学,2011,29(6):645-646

[7] 孙雪峰,叶任高.尿红细胞形态及其临床意义[J].中国实用内科杂志,2002,2(1):19-21

[8] 程文文.血尿检验中尿红细胞平均体积的定位应用分析[J].临床医药文献杂志,2015,2(24):5112-5113

[9] 俞倩,陈保德,徐卫益.UF-1000i尿有形成分分析仪研究性参数在血尿来源鉴别中的应用[J].实验与检验医学,2014,32(3):257-259

【收稿日期】 2017-08-17

(上接第965页)

drogenism downregulates aromatase in luteinized granulosa cells in polycystic ovary syndrome women [J]. *Reproduction*, 2015, 150(4):289-296

[8] Bianchi VE, Locatelli V. Testosterone a key factor in gender related metabolic syndrome [J]. *Obes Rev*, 2018, 19(4):557-575

[9] Suttonmcdowall ML, Gilchrist RB, Thompson JG. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence [J]. *Reproduction*, 2010, 139(4):685-695

[10] Nishi Y, Yanase T, Mu Y, et al. Establishment and characterization of a steroidogenic human granulosa-like tumor cell line, KGN, that expresses functional follicle-stimulating hormone receptor [J]. *Endocrinology*, 2001, 142(1):437-445

[11] Suttonmcdowall ML, Mottershead DG, Gardner DK, et al. Metabolic differences in bovine cumulus-oocyte complexes matured in vitro in the presence or absence of follicle-stimulating hormone and bone morphogenetic protein 15 [J]. *Biol Reprod*, 2012, 87(4):87

[12] Yuan B, Liang S, Kwon JW, et al. The role of glucose metabolism on porcine oocyte cytoplasmic maturation and its possible mechanisms [J]. *PLoS One*, 2016, 11(12):

e0168329

[13] Alvarez GM, Ferretti EL, Gutnisky C, et al. Modulation of glycolysis and the pentose phosphate pathway influences porcine oocyte in vitro maturation [J]. *Reprod Domest Anim*, 2013, 48(4):545-553

[14] Wang H, Wang X, Zhu Y, et al. Increased androgen levels in rats impair glucose-stimulated insulin secretion through disruption of pancreatic beta cell mitochondrial function [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2015, 154:254-266

[15] Richardson M, Ingamells SC, Cameron I, et al. Stimulation of lactate production in human granulosa cells by metformin and potential involvement of adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009, 94(2):670-677

[16] Sivitz WI, Yorek MA. Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2010, 12(4):537-577

[17] Gutnisky C, Morado S, Dalvit GC, et al. Glycolytic pathway activity: effect on IVM and oxidative metabolism of bovine oocytes [J]. *Reprod Fertil Dev*, 2013, 25(7):1026-1035

【收稿日期】 2018-03-16