

· 基础医学 ·

二甲双胍对 IFN- γ 诱导的人卵巢颗粒细胞损伤的保护作用

姚雪, 刘烁, 俞宛君, 陶泽华, 蒋雅斓, 陈少聘, 冉银宏, 夏圣*

江苏大学医学院免疫学教研室, 江苏 镇江 212013

[摘要] 目的:探讨二甲双胍对干扰素(interferon, IFN)- γ 诱导的人卵巢颗粒细胞KGN功能损伤的效应及可能机制。方法:采用CCK-8法检测不同浓度二甲双胍单独及与IFN- γ 共处理对KGN细胞活力的影响,并观察细胞生长状态的变化;流式细胞术检测不同处理对KGN细胞凋亡及周期的影响;q-PCR法检测细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂1A(cyclin dependent kinase inhibitor 1A, CDKN1A)mRNA的表达。结果:IFN- γ 可抑制KGN细胞活力、阻滞细胞从G0-G1期进入S期,并促进凋亡($P < 0.05$);二甲双胍单独处理几乎不影响KGN细胞功能;但二甲双胍与IFN- γ 共同作用可提高损伤的KGN细胞活力,缓解IFN- γ 引起的细胞凋亡及周期阻滞,并抑制细胞周期负性调节蛋白CDKN1A表达的异常上调。结论:二甲双胍可减轻IFN- γ 诱导的KGN细胞功能损伤,并且可能是通过下调细胞周期负性调节蛋白CDKN1A的异常表达发挥保护作用。

[关键词] 二甲双胍; IFN- γ ; 人卵巢颗粒细胞KGN; 凋亡; 细胞周期

[中图分类号] R392.12

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2021)08-1135-06

doi:10.7655/NYDXBNS20210805

Protective effects of metformin on KGN cells injury induced by IFN- γ

YAO Xue, LIU Shuo, YU Wanjun, TAO Zehua, JIANG Yalan, CHEN Shaodan, RAN Yinhong, XIA Sheng*

Department of Immunology, School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to investigate the effects and potential mechanisms of metformin on the inflammatory cytokine interferon (IFN)- γ induced cell damage in human ovarian granulosa cells KGN. **Methods:** The effects of metformin alone and with IFN- γ on the viability of KGN cells were detected using CCK-8 kit, and the cell growth status of KGN cells were observed under microscope. The apoptotic cells and the cell cycle in KGN cells were analyzed using flow cytometry. The mRNA expression levels of cyclin dependent kinase inhibitor 1A (CDKN1A), a gene related to cell cycle regulation, were analyzed using q-PCR. **Results:** IFN- γ treatment inhibited the vitality of KGN cells through blocking these cells from G0-G1 phase to S phase and promoting into apoptosis. Although metformin treatment alone had no obvious effects on the KGN cells, it alleviated the apoptosis in KGN cells and reversed the cell cycle which induced by IFN- γ . Moreover, metformin significantly inhibited the expression levels of CDKN1A in IFN- γ treated KGN cells. **Conclusion:** Metformin had a protective role on the IFN- γ induced cell injury in KGN cells by down-regulating the abnormal expression of the negative cell cycle regulator CDKN1A in these cells.

[Key words] metformin; IFN- γ ; human ovarian granulosa cells; KGN; apoptosis; cell cycle

[J Nanjing Med Univ, 2021, 41(08):1135-1140]

多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)是一种好发于育龄期妇女的内分泌紊乱疾病^[1]。近年来的研究结果提示,PCOS的发生发展与慢性炎症也密切相关^[2]。干扰素(interferon, IFN)- γ

[基金项目] 国家自然科学基金资助(81871234)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: xiasheng1519@163.com

是一种炎性细胞因子,在卵泡发育过程中主要分布在颗粒细胞(granular cells, GC)和卵母细胞中。颗粒细胞的增殖、分化在卵泡生长发育过程中起着十分重要的作用,而颗粒细胞的大量凋亡会影响卵泡细胞的正常发育、成熟,进而导致疾病产生^[3]。本课题组前期体外实验研究发现,IFN- γ 作用48 h后可明显抑制人卵巢颗粒细胞KGN的增殖并促进细胞凋

亡,但具体机制尚未探明^[4]。二甲双胍(Metformin, Met)是一种胰岛素增敏剂,临床上主要用于治疗2型糖尿病^[5]。近年来的一些研究发现,除降低血糖外, Met 还可通过降低促炎因子表达水平、激活腺苷酸活化蛋白激酶途径、抑制哺乳动物雷帕霉素靶蛋白合成通路、抑制氧化应激等机制发挥抗炎作用^[6]。但目前对于 Met 能否改善炎症因子导致的卵巢颗粒细胞的细胞功能损伤尚不清楚。本研究旨在探讨 Met 对 IFN- γ 诱导的 KGN 细胞功能损伤的潜在保护作用及其可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料

实验细胞株人卵巢颗粒细胞 KGN 细胞(上海江林生物科技有限公司); IFN- γ (上海达科为生物技术有限公司); Met(Sigma-Aldrich 公司, 美国); CCK-8 检测试剂盒(上海碧云天生物公司); 细胞周期试剂盒(上海前尘生物科技有限公司); 细胞凋亡检测试剂盒(杭州联科生物技术有限公司); TRIzol RNA 提取试剂、逆转录试剂和 Real Time PCR 试剂(TaKaRa 公司, 日本); DMEM(上海源培生物公司); 胎牛血清(Nobimpex 公司, 德国); 青霉素、链霉素和胰酶(Sigma-Aldrich 公司, 美国)。细胞培养箱(Thermo 公司, 美国); 生物安全柜(青岛海尔生物医疗公司); 倒置显微镜(Olympus 公司, 日本); 超高速低温离心机(Beckman Coulter 公司, 美国); 酶标仪(Rayto 公司, 美国); 流式细胞仪 CytoFLEX(Beckman Coulter 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

人卵巢颗粒细胞 KGN 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 中, 并加入终浓度为 100 U/mL 的青霉素和链霉素, 置于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱培养, 每 48 h 换 1 次新鲜培养液。

1.2.2 CCK-8 法检测 KGN 细胞活力

实验分组: 对照组、IFN- γ 处理组、Met 低/中/高浓度梯度组、IFN- γ 与 Met 低/中/高浓度梯度共处理组。取处于对数生长期 KGN 细胞, 用胰酶常规消化, 将 KGN 细胞按 3×10^3 个/孔, 接种至 96 孔板, 每组设置 5 个复孔, 置于 37 °C 培养箱过夜预培养。第 2 天对照组常规换液, 各处理组则根据分组要求, 分别加入含 IFN- γ (250 ng/mL) 和 Met(1、10、100 μ mol/L) 的细胞培养液。将细胞置于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱, 分别培养 24、48 和 72 h 后, 每孔加入 10 μ L

CCK-8 反应试剂, 继续置于培养箱孵育 1 h 后, 酶标仪于 450 nm 检测各孔吸光度。本实验中 Met 的浓度梯度参考以往的文献^[7-8]设置。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡

取对数生长期 KGN 细胞, 胰酶常规消化后以 6×10^4 个/孔培养于 6 孔板内, 每组设置 3 个复孔, 预培养 1~2 d; 各处理组中分别加入相应浓度的细胞培养液, 处理 KGN 细胞 48 h 后, 用不含 EDTA 的胰酶消化收集细胞, 并用预冷的 PBS 洗涤 2 遍。用标记细胞凋亡的结合缓冲液调节 KGN 细胞浓度为 5×10^5 个/mL。在 100 μ L 细胞悬液中加入 1 μ L Annexin V-APC 和 2 μ L 7-AAD; 混匀, 室温避光孵育 15 min。用结合缓冲液洗去未结合抗体, 再用 200 μ L 预冷的 PBS 重悬细胞, 流式细胞仪分析细胞凋亡。

1.2.4 细胞周期检测

各处理组中分别加入相应浓度的细胞培养液处理 KGN 细胞 72 h 后, 收集细胞并用预冷的 PBS 洗涤 2 遍; 加入 2 mL 70% 预冷乙醇固定细胞, 轻轻混匀, 4 °C 过夜; 离心去除固定液, 用预冷的 PBS 洗涤细胞 2~3 次, 离心, 弃上清; 按照细胞周期试剂盒说明书, 分别加入 100 μ L 试剂 A(胰蛋白酶等), 轻轻混匀, 室温放置 10 min; 加入 100 μ L 试剂 B(RNA 酶、胰酶抑制剂等)轻轻混匀, 室温放置 10 min; 加入 150 μ L 试剂 C(碘化丙啶等)轻轻混匀, 室温放置 15 min。上机前用 300 目尼龙筛网过滤细胞液, 用流式细胞仪检测细胞周期。

1.2.5 q-PCR 检测细胞周期负性调节蛋白 CDKN1A mRNA 的表达

TRIzol 法提取各处理组的 KGN 细胞总 RNA, 按照日本 TaKaRa 公司的逆转录试剂说明书将 RNA 逆转录为 cDNA, 置 -20 °C 保存。以 β -actin 为内参基因, qRT-PCR 反应体系(20 μ L): 2 \times TB Green Master Mix 10 μ L, cDNA 2 μ L, 上下游引物(10 μ mol/L)各 0.4 μ L, 无菌蒸馏水 7.2 μ L。反应程序: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 5 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共进行 30 个循环。RNA 引物由上海生工生物工程有限公司合成。 β -actin: 正义 5'-TCTGGCACCA-CACCTTCTA-3', 反义 5'-AGGCATACAGGGACAG-CAC-3'; CDKN1A: 正义 5'-CTCATCCCGTGTTC-TCCCTT-3', 反义 5'-GTACCAC-CCAGCGGACAAGT-3'。通过公式 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算基因的相对表达量。所有实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

实验结果数据使用 Graphpad Prism 5 软件进行

统计分析,实验结果来自至少3次重复实验,计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组比较采用方差分析,两两比较采用SNK法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Met可提高IFN- γ 诱导损伤的KGN细胞活力

CCK-8结果(图1)显示,与对照组相比,各处理组细胞在培养24 h及72 h后,除IFN- γ 处理组细胞活力受到抑制($P < 0.05$)外,其他组未见明显变化。而培养48 h后,IFN- γ 处理组细胞活力受到明显抑制($P < 0.01$,图1);低、中、高浓度的Met单独处理对KGN活力均无明显影响,但Met与IFN- γ 共同作用可减缓IFN- γ 对KGN细胞活力的抑制。其中,以中浓度Met处理组(10 $\mu\text{mol/L}$)的缓解效应最为明显($P < 0.01$,图1),故后续试验均采用此药物浓度和处理时间。

2.2 Met可改善IFN- γ 对KGN细胞生长状态的影响

显微镜下观察各处理细胞的生长状态(图2),可见IFN- γ 作用48 h后可使细胞增殖的速度和密度明显降低,且部分细胞皱缩、变圆。Met单独处理对KGN细胞的增殖效应无明显影响;但Met与IFN- γ 共同作用则在一定程度上改善了被IFN- γ 抑制的细胞增殖。

2.3 Met可减轻IFN- γ 对KGN细胞凋亡的损伤

各处理组对KGN细胞处理48 h后,流式分析结果显示,对照组与Met处理组的细胞凋亡比例统计分析无显著差异($P > 0.05$)。而IFN- γ 处理后,细胞凋亡比例与对照组相比差异明显($P < 0.01$)。同时, Met+IFN- γ 处理组细胞凋亡比例与单独IFN- γ 处理组相比明显降低($P < 0.05$,图3)。以上结果表明, Met可减轻IFN- γ 对KGN细胞凋亡的损伤。

2.4 Met可缓解IFN- γ 对KGN的细胞周期阻滞

流式分析时,先对KGN细胞设门,去除细胞碎

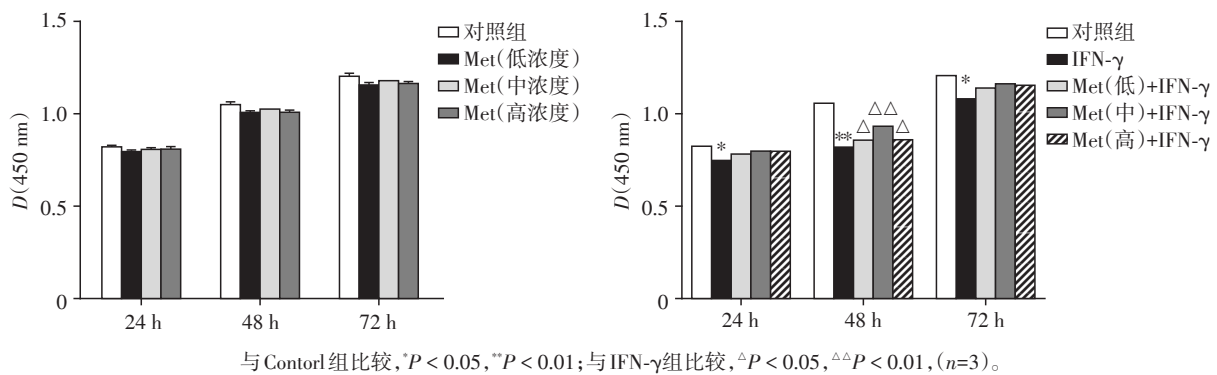


图1 CCK-8检测不同处理对KGN细胞活力的影响
Figure 1 The effects of different treatments on KGN cells viability detected by CCK-8

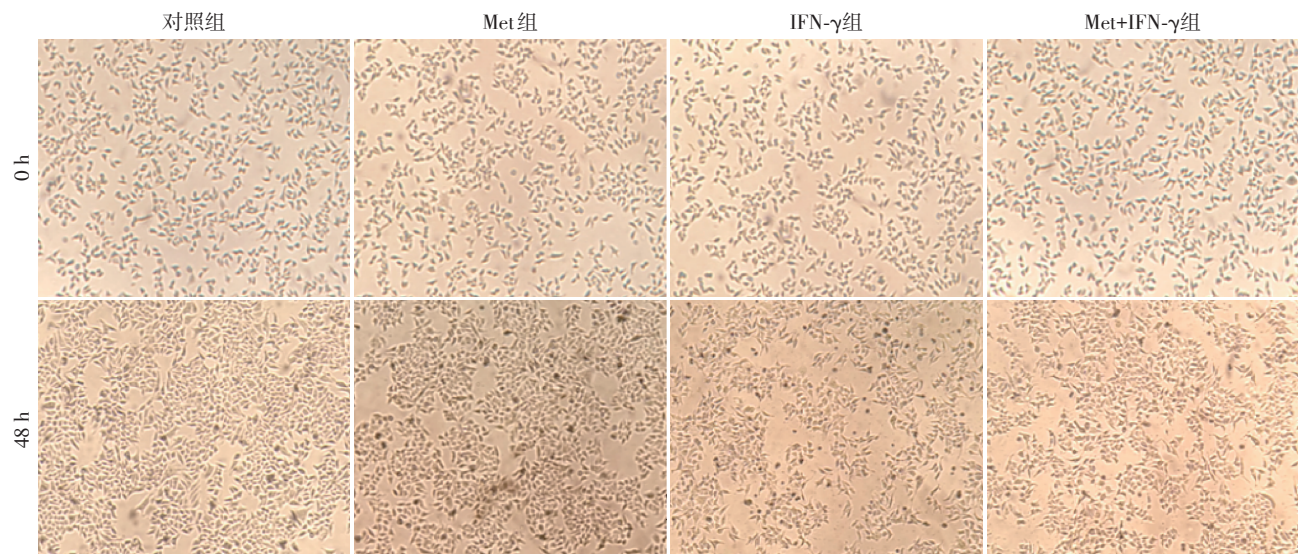
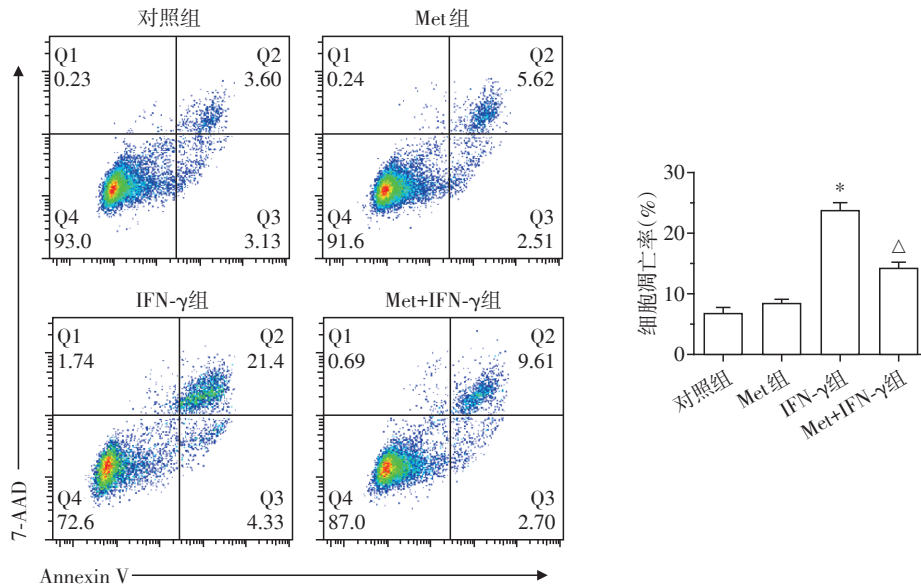


图2 不同处理对KGN细胞生长状态的影响($\times 40$)
Figure 2 The effects of different treatments on the growth of KGN cells ($\times 40$)

片;再对细胞周期分析的单细胞群体设门,去除黏连细胞,继而分析单细胞中处于各细胞周期的细胞比例。结果显示(图4),与对照组G0-G1期(54.432±2.526)、S期(31.732±1.965)、G2-M期(13.637±1.816)相比, Met处理组的各周期细胞比例均无明显变化;而与对照组相比, IFN-γ处理组G0-G1期细胞比例(76.673±2.432)明显增加($P < 0.01$), S期比例

(12.137±1.586)下降($P < 0.05$), G2-M期比例(11.276±1.398)也稍有下降但无统计学意义($P > 0.05$);而与IFN-γ处理组相比, Met+IFN-γ处理组G0-G1期细胞比例(71.152±1.861)下降,且S期比例(19.572±1.615)升高,二者结果间的差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。以上结果提示 Met可缓解IFN-γ对KGN细胞由G0-G1期进入的S期阻滞效应。



与对照组比较, * $P < 0.01$; 与IFN-γ组比较, [△] $P < 0.05$ (n=3)。

图3 流式检测不同处理对KGN细胞凋亡的影响

Figure 3 The effects of different treatments on KGN cells apoptosis detected by flow cytometry

2.5 Met对细胞周期的调控与CDKN1A下调有关

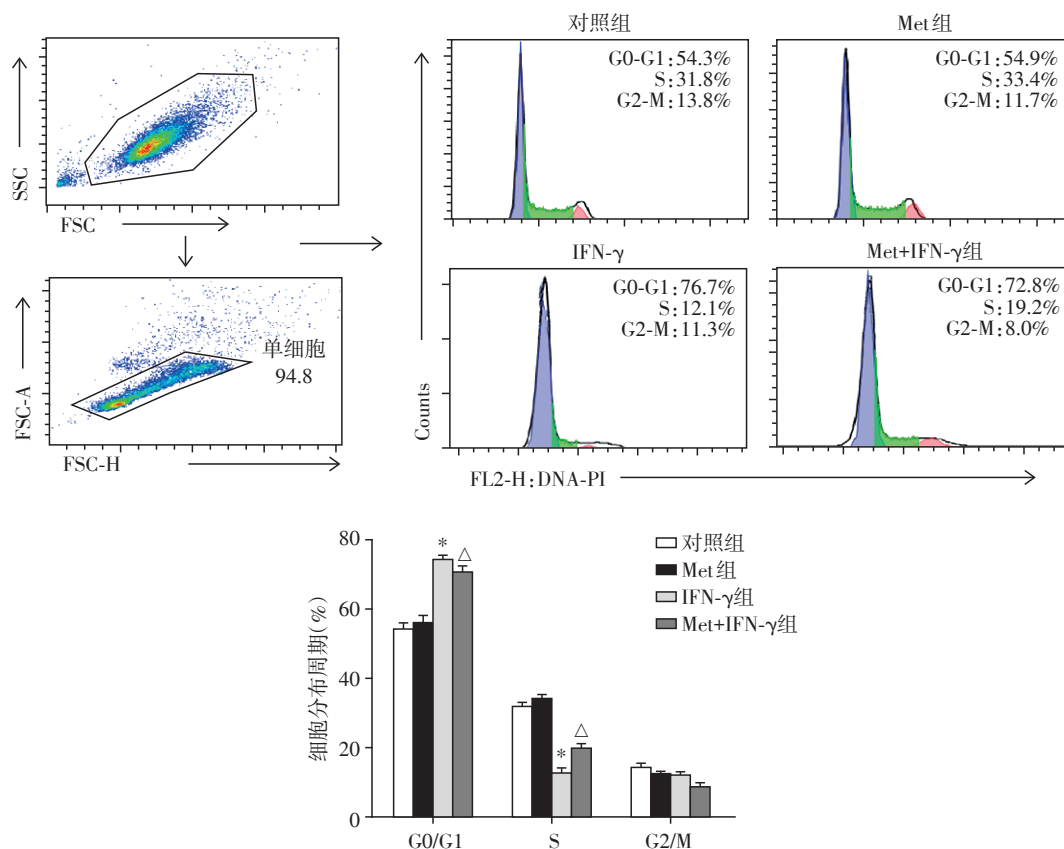
利用q-PCR法检测各处理组CDKN1A mRNA的表达,结果显示,IFN-γ处理可使KGN细胞的CDKN1A的mRNA表达上调约5倍,说明IFN-γ诱导的KGN G0-G1期阻滞可能与CDKN1A异常上调有关。当用Met处理后, Met可在一定程度上降低IFN-γ对CDKN1A的诱导表达($P < 0.05$,图5)。此结果提示, Met可能是通过下调IFN-γ诱导的CDKN1A异常表达,从而减轻了IFN-γ引起的KGN细胞G0-G1期阻滞。

3 讨论

PCOS是一种与异常卵泡增生相关的内分泌紊乱疾病,GC的增殖受抑被认为是异常卵泡成熟的关键因素^[9]。既往研究表明,IFN-γ是卵泡闭锁的重要生理性调节因子,在卵泡发育早期未分化颗粒细胞Fas受体表达以及随后的凋亡反应中发挥了关键作用^[3]。此外,基于其细胞抑制、抗增殖和促凋亡效应,IFN-γ被认为可应用于多种类型癌症的辅助免疫

治疗^[10-11]。前期研究结果发现,PCOS患者外周血中IFN-γ的含量较健康人明显增多,且IFN-γ体外作用于人卵巢颗粒细胞KGN可明显抑制其增殖并促进凋亡;表明炎症因子IFN-γ可能是PCOS中导致KGN细胞功能损伤的重要因素之一^[4]。

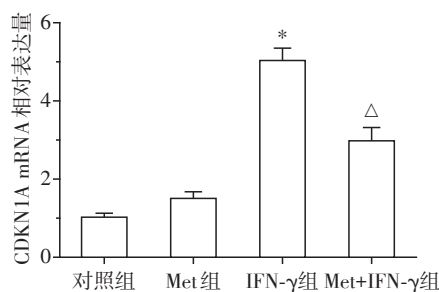
Met是一种常规降糖药,可作为胰岛素增敏剂,降低高胰岛素血症并抑制女性卵巢中过多雄激素的产生^[12]。此外,在PCOS大鼠模型中, Met已被证明可抑制卵泡膜细胞增殖、减少小卵泡和囊肿的数量,进而提高排卵率^[13]。最近有研究发现Met可通过有机阳离子转运蛋白OCTs诱导大鼠卵巢细胞AMPK磷酸化并减少血管内皮生长因子VEGF的产生^[8]。本实验的研究结果显示Met单独作用对KGN细胞增殖、凋亡等功能无明显影响,原因可能是本实验使用的Met的浓度较低,也可能是实验细胞株与其他研究来源不同。但本研究发现Met与IFN-γ共同作用可提高损伤的KGN的细胞活力,缓解IFN-γ引起的细胞凋亡及G0-G1期阻滞,提示Met可减轻IFN-γ诱导的KGN细胞功能损伤。但Met能否改



与对照组比较, $P < 0.01$; 与IFN- γ 组比较, $\Delta P < 0.05 (n=3)$ 。

图4 不同处理对KGN细胞周期分布的影响

Figure 4 Effects of different treatments on the cell cycle distribution of KGN



与对照组比较, $P < 0.01$; 与IFN- γ 组比较, $\Delta P < 0.05 (n=3)$ 。

图5 细胞周期复性调节蛋白CDKN1A mRNA的表达

Figure 5 The mRNA expression of cell cycle refolding regulatory protein CDKN1A

善人卵巢颗粒细胞KGN的其他生物学行为,如细胞代谢,激素分泌及凋亡相关信号转导通路等还需进一步探究。

细胞功能紊乱常与细胞周期失调相关。文献报道, Met可通过不同作用方式调节细胞周期来抑制肿瘤细胞的增殖^[14-15]。其中, Met可通过下调细胞周期调节蛋白 cyclin D1 的表达和端粒酶活性阻断 G0/G1 细胞周期, 抑制人结肠癌 SW480 细胞生长^[16]。因此猜测, Met可能是通过调控细胞周期相关基因的

表达,进而影响细胞功能。P21 基因是近年来发现的细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂家族中的重要成员,可通过抑制细胞周期蛋白依赖性激酶复合物 (cyclin-dependent kinases, CDKs) 活性,协调细胞周期、DNA 复制与修复之间的关系。其中, CDKN1A 是细胞周期负性调节因子 p21 的编码基因, p21 的过度表达常提示细胞周期阻滞^[17]。CDKN1A 除了在细胞周期调控中发挥作用外,还参与了细胞分化、凋亡、自噬和衰老等过程^[18]。本研究结果显示, IFN- γ 处理将 KGN 的 CDKN1A 表达上调了约 5 倍。Met 与 IFN- γ 的联合处理可降低 CDKN1A 的异常表达且差异具有统计学意义,提示 CDKN1A 下调可能与 Met 一定程度上缓解了 IFN- γ 引起的 KGN 细胞 G0-G1 周期阻滞相关,但其缓解周期阻滞的具体机制仍需进一步探索。

综上所述,本研究证实 Met 可通过抑制细胞周期负性调节蛋白 CDKN1A 表达的异常上调,缓解 IFN- γ 引起的 KGN 细胞周期阻滞及细胞凋亡,从而发挥保护作用,可为指导 PCOS 患者的临床用药提供新的视角。

[参考文献]

- [1] PATEL S. Polycystic ovary syndrome (PCOS), an inflammatory, systemic, lifestyle endocrinopathy [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2018, 182: 27-36
- [2] SHAABAN Z, KHORADMEHR A, AMIRI-YEKTA A, et al. Pathophysiologic mechanisms of obesity- and chronic inflammation-related genes in etiology of polycystic ovary syndrome [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2019, 22(12): 1378-1386
- [3] LEE H J, KIM J Y, PARK J E, et al. Induction of fas-mediated apoptosis by interferon- γ is dependent on granulosa cell differentiation and follicular maturation in the rat ovary [J]. *Dev Reprod*, 2016, 20(4): 315-329
- [4] 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
- [5] DIAMANTI-KANDARAKIS E, CHRISTAKOU C D, KANDARAKI E, et al. Metformin: an old medication of new fashion: evolving new molecular mechanisms and clinical implications in polycystic ovary syndrome [J]. *Eur J Endocrinol*, 2010, 162(2): 193-212
- [6] SAISHO Y. Metformin and inflammation: its potential beyond glucose-lowering effect, endocrine [J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2015, 15(3): 196-205
- [7] RICE S, PELLATT L J, BRYAN S J, et al. Action of metformin on the insulin-signaling pathway and on glucose transport in human granulosa cells [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011, 96(3): E427-435
- [8] DI PIETRO M, VELAZQUEZ C, MATZKIN M E, et al. Metformin has a direct effect on ovarian cells that is dependent on organic cation transporters [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2020, 499: 110591
- [9] MUNAKATA Y, KAWAHARA M R, SHIRATSUKI S, et al. Gene expression patterns in granulosa cells and oocytes at various stages of follicle development as well as in vitro grown oocyte-and-granulosa cell complexes [J]. *J Reprod Dev*, 2016, 62(4): 359-366
- [10] JORGOVANOVIC D, SONG M, WANG L, et al. Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: a review [J]. *Biomark Res*, 2020, 8: 49
- [11] MORALES-MANTILLA D E, KING K Y. The role of interferon-gamma in hematopoietic stem cell development, homeostasis, and disease [J]. *Curr Stem Cell Rep*, 2018, 4(3): 264-271
- [12] SIEBERT T I, VIOLA M I, STEYN D W, et al. Is metformin indicated as primary ovulation induction agent in women with PCOS? A systematic review and meta-analysis [J]. *Gynecol Obstet Invest*, 2012, 73(4): 304-313
- [13] DI PIETRO M, PARBORELL F, IRUSTA G, et al. Metformin regulates ovarian angiogenesis and follicular development in a female polycystic ovary syndrome rat model [J]. *Endocrinology*, 2015, 156(4): 1453-1463
- [14] ZHANG Y, GUAN M, ZHENG Z, et al. Effects of metformin on CD133+ colorectal cancer cells in diabetic patients [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e81264
- [15] JEONG Y K, KIM M S, LEE J Y, et al. Metformin radiosensitizes p53-deficient colorectal cancer cells through induction of G2/M arrest and inhibition of DNA repair proteins [J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0143596
- [16] 周小智, 薛耀明, 朱波, 等. 二甲双胍对人结直肠癌细胞株 SW-480 增殖的影响 [J]. *南方医科大学学报*, 2010, 30(8): 1935-1938
- [17] ZHANG Y, HU K, HU Y, et al. Bone marrow mesenchymal stromal cells affect the cell cycle arrest effect of genotoxic agents on acute lymphocytic leukemia cells via p21 down-regulation [J]. *Ann Hematol*, 2014, 93(9): 1499-1508
- [18] KREIS N N, LOUWEN F, YUAN J. The multifaceted p21 (Cip1/Waf1) in cell differentiation, migration and cancer therapy [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(9): 1220

[收稿日期] 2021-03-23