

c-fos 和 *CYP17* 对多囊卵巢综合征 (PCOS) 患者卵巢颗粒细胞雄激素分泌过多的影响及机制

桑敏^{1,2}, 李晶², 张跃辉², 吴效科²

1. 黑龙江中医药大学中西医结合博士后流动站, 哈尔滨 150040

2. 黑龙江中医药大学附属第一医院妇产科, 哈尔滨 150040

摘要 为研究多囊卵巢综合征(PCOS)患者卵巢颗粒细胞中 *c-fos* 及 *CYP17* 基因表达的变化, 探讨 *c-fos* 及 *CYP17* 基因对 PCOS 卵巢颗粒细胞雄激素分泌的影响及可能的作用机制, 对拟行 IVF/ICSI-ET 的 PCOS 患者及非 PCOS 患者分为对照组 (非 PCOS 患者) 和 PCOS 组 (PCOS 患者), 两组患者的卵巢颗粒细胞进行体外培养 48 h, 利用放射免疫法检测细胞上清液中的雌二醇 (E₂)、孕酮 (P)、睾酮 (T) 的水平; 利用 2-NBDG 标记葡萄糖检测颗粒细胞的葡萄糖摄取能力; 采用免疫蛋白印迹 (Western Blot) 法分别评估颗粒细胞中 *c-fos* 及 *CYP17* 基因的表达变化。结果发现, PCOS 组患者与对照组患者相比, 颗粒细胞培养上清液中睾酮水平升高 ($P < 0.05$)、孕酮水平降低 ($P < 0.05$)、雌二醇水平无明显变化 ($P > 0.05$), 且颗粒细胞对 2-NBDG 标记葡萄糖摄取明显降低 ($P < 0.05$), 提示 PCOS 患者卵巢颗粒细胞雄激素分泌异常增高, 并存在糖代谢异常。与对照组患者相比, PCOS 组患者颗粒细胞 *CYP17* 基因表达升高 ($P < 0.05$), *c-fos* 基因表达降低 ($P < 0.05$), 提示颗粒细胞 *c-fos* 基因异常低表达, 可能降低了对 *CYP17* 基因的抑制作用, 使 *CYP17* 高表达, 可能是卵巢颗粒细胞雄激素分泌增加的原因之一。

关键词 多囊卵巢综合征; 人卵巢颗粒细胞; *c-fos*; *CYP17*; 雄激素

中图分类号 R711.6

文献标志码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2015.22.015

The mechanism of *c-fos* gene regulation of 17- α hydroxylase (*CYP17*) expression and testosterone production in ovarian granulosa cells from polycystic ovary syndrome patients

SANG Min^{1,2}, LI Jing², ZHANG Yuehui², WU Xiaoke²

1. The Post Doctoral Station of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

2. Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract The objective of this study is to confirm the role of *c-fos* in the regulation of 17- α hydroxylase (*CYP17*) and androgen production in granulosa cells from Polycystic ovary syndrome (PCOS) patients. The ovarian granulosa cells from the PCOS and non-PCOS patients during IVF/ICSI - ET are isolated and divided into two groups: The PCOS group and the control group, then they are cultured in vitro for 48 h. The following techniques are then used: The radioimmunoassay to determine the level of estradiol, progesterone, testosterone; The 2-NBDG as the fluorescence probe to detect the glucose uptake in granulosa cells; And Western Blot

收稿日期: 2015-04-16; 修回日期: 2015-09-18

基金项目: 2013 年度黑龙江省博士后基金项目 (LBH-Z13199); 第 56 批中国博士后科学基金面上项目 (2014M561383)

作者简介: 桑敏, 副主任医师, 研究方向为妇科内分泌, 电子信箱: sangmin128@163.com

引用格式: 桑敏, 李晶, 张跃辉, 等. *c-fos* 和 *CYP17* 对多囊卵巢综合征 (PCOS) 患者卵巢颗粒细胞雄激素分泌过多的影响及机制 [J]. 科技导报, 2015, 33 (22): 89-92.

technology to analyze the cellular expressions of *c-fos*, and *CYP17*. The results show that compared with the control group, the testosterone secretion within ovarian granulosa cells from PCOS patients is increased ($P<0.05$), the progesterone level is significantly lower ($P<0.05$), the estradiol ($P>0.05$) does not change significantly, and the 2-NBDG uptake in granulosa cells is lower ($P<0.05$), indicating that the testosterone secretion within ovarian granulosa cells from PCOS patients is significantly increased, and the glucose metabolic disorders are present in granulosa cells from PCOS patients. The Western Blot shows that *CYP17* ($P<0.05$) has a high expression in ovarian granulosa cells from PCOS patients compared with the control group patients, and the expression of *c-fos* is decreased ($P<0.05$), indicating that the *c-fos* may be one of the factors responsible for the *CYP17* repression, and it may be one of the reasons for the increase in the testosterone production of granulosa cells.

Keywords polycystic ovarian syndrome; human ovarian granulosa cells; *c-fos*; *CYP17*; testosterone

多囊卵巢综合征(PCOS)是临床上常见的、发病机制尚未完全明确的内分泌代谢性疾病,其两大主要内分泌特征为高雄激素血症、胰岛素抵抗(IR)^[1]。高雄激素血症和IR相互作用参与了PCOS的病理过程。卵巢自身功能的异常与PCOS的发生有关。卵巢颗粒细胞是卵巢重要的功能细胞。对大鼠卵巢*c-fos*的定位表达实验中发现,*c-fos*在颗粒细胞中有表达^[2]。对PCOS患者卵巢及脂肪组织的研究也表明*c-fos*表达显著降低^[3]。*CYP17*是PCOS高雄激素血症发生的一个关键因子。在对卵泡膜细胞的研究中发现,*c-fos*可抑制*CYP17*的表达,使雄激素合成减少。在卵泡膜细胞和颗粒细胞中,沉默*c-fos*基因后使*CYP17* mRNA的表达显著增强^[4]。这些提示,PCOS患者卵巢颗粒细胞作为卵巢重要的细胞,其功能可能发生变化,其*c-fos*基因表达可能出现异常改变,且其通过对*CYP17*的调节将影响雄激素的合成。

本研究通过对PCOS及非PCOS患者卵巢颗粒细胞进行体外培养,检测其雄激素水平的差异及*c-fos*基因及*CYP17*表达的变化,以明确PCOS卵巢颗粒细胞雄激素分泌的变化,探讨*c-fos*及*CYP17*基因表达的异常变化对雄激素分泌的影响及可能的作用机制。

1 资料与方法

1.1 研究对象及分组

以2010年7月—2011年12月在哈尔滨医科大学附属第一医院生殖中心接受IVF/ICSI-ET治疗的20例不孕妇女为研究对象。其中不孕原因为输卵管及男方因素的非PCOS患者10例。PCOS不孕患者10例,诊断根据2003年鹿特丹标准(ESHRE/ASRM)即:1)稀发排卵和/或者无排卵;2)临床和/或生化高雄激素血症,并除外其他可能致病因素(如先天性肾上腺皮质增生,分泌雄激素的肿瘤,库欣综合征);3)超声显示多囊卵巢。如果患者符合以上3项中2项即可诊断为PCOS。所有患者均为初次进入IVF/ICSI-ET治疗周期,空腹血糖均无异常,无全身性疾病,无其他内分泌系统疾病及妇科疾病。所有患者均签署知情同意书。

将行IVF/ICSI-ET治疗的20例不孕妇女分为两组。1)对照组:10例不孕原因为输卵管及男方因素的非PCOS患者,平均年龄为(28.6±2.2)岁,空腹血糖均在正常范围,月经周期规律,月经第2、3天测定基础血性激素6项:卵泡刺激素

(FSH)、促黄体生成素(LH)、雌二醇(E₂)、睾酮(T)、孕酮(P)、催乳素(PRL)均在正常范围内。2) PCOS组:10例PCOS患者,平均年龄为(30.07±2.8)岁,空腹血糖均在正常范围。

1.2 研究方法和测定内容

1.2.1 标本采集

两组均采用超促排卵长方案治疗,根据阴道B超和血清中LH水平检测卵泡发育。当B超显示有1个卵泡平均直径≥18 mm,2个卵泡平均直径≥17 mm,或者3个卵泡平均直径≥16 mm时,于当日21:30给予肌肉注射绒毛膜促性腺素(HCG)5000或10000单位,36 h后在阴道超声引导下进行采卵术,平均取卵数12个。取卵后留取卵泡液。

1.2.2 人颗粒细胞分离与培养

收集两组患者残余卵泡液,分别置于离心管中,室温下以1500 r/min离心处理5 min,弃上清液,使用磷酸盐缓冲液(PBS)使细胞悬浮后,以1:1的比例将细胞悬液缓慢加入到人淋巴细胞分离液(Ficoll液)上,以1500 r/min离心处理10 min。小心吸取位于两种液体中间的细胞层(颗粒细胞)。用PBS洗涤2次后,使用1000 μL加样器反复轻轻吹打,直至将细胞吹打为单个细胞。使用0.4%台盼蓝检测细胞活性。加入DMEM/F12(含10% FBS(胎牛血清),青霉素100 IU/mL,链霉素0.1 mg/mL)重悬细胞,使细胞密度为1.5×10⁵/mL,分别接种于24孔板上,每孔加入培养液1000 μL,做3个复孔。置于37℃,5% CO₂培养箱中孵育48 h。显微镜下观察细胞贴壁伸展。显微镜下观察细胞贴壁率>80%。收集两组患者培养液的上清液,用于甾体激素检测。

1.2.3 培养液甾体激素水平测定

取上述两组患者卵巢颗粒细胞培养液的部分上清液,置于-80℃冰箱内保存。采用化学发光法测定上清中E₂、T、P水平。甾体激素水平检测在黑龙江省医院同位素科进行。

1.2.4 卵巢颗粒细胞葡萄糖摄取的测定

将750 μL PBS中加入5 mg的2-NBDG备用。预先预热倒置荧光显微镜30 min。将贴壁良好的细胞用培养液清洗2遍,将杂质清洗干净。抽掉培养液,加入7.5 μL 2-NBDG和1 mL的培养液,放入37℃,5% CO₂培养箱中培养20 min,时间可稍稍延长,但不超过30 min。弃去2-NBDG液,然后用灭过菌的PBS清洗细胞2~3遍后,置于倒置荧光显微镜下观察细胞的荧光亮度。葡萄糖被荧光标记,通过荧光强度可以检

测细胞对葡萄糖的摄取情况。用 Image Pro Plus 6.0 软件对平均荧光强度值进行统计分析。

1.2.5 卵巢颗粒细胞中 *c-fos* 及 *CYP17* 基因的表达测定

分别提取两组细胞蛋白,二喹啉甲酸蛋白浓度测定法(BCA法)测定蛋白浓度。上样量 40 μg。10% SDS-PAGE 电泳 100 mV, 90 min。4℃冷库 100 mV, 90 min 转膜。5%的脱脂牛奶室温下封闭 1 h。*c-fos* 抗体(1:400 稀释), 4℃孵育过夜, 抗兔二抗(1:3000 稀释), *CYP17* 抗体(1:400 稀释), 4℃孵育过夜, 抗兔二抗(1:3000 稀释)室温孵育 1 h, 于暗室曝光。

1.3 实验器材及试剂

兔抗人 *c-fos* (SANTA CRUZE, 美国), 兔抗人 *CYP17* (SANTA CRUZE, 美国), BSA (Sigma, 美国), Western or IP 细胞裂解液 (Biyuntian, 中国), PMSF (Sigma, 美国), SDS (Sigma, 美国), Tris·HCL (Sigma, 美国), β-Mercaptoethanol (Sigma, 美国), DMEM (GIBCO, 美国), 淋巴细胞分离液 (Percoll) (GE Healthcare Bio-science AB, 瑞典), FBS (GIBCO, 美国), 青一链霉素 (GIBCO, 美国), PBS (GIBCO, 美国), 24 孔培养板 (Corning, 德国), T、E、P 试剂盒 (罗氏, 美国)。Immulite (西门子, 德国), 超净工作台 (SW-CL, 中国江苏)。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析, 所有数据均以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多样本间采用单因素 ANOVA 分析。两样本间方差, 齐采用 *t* 检验, 不齐采用 *t'* 检验, $P < 0.05$ 有显著统计学意义。

2 结果与分析

2.1 不同时间点体外培养人卵巢颗粒细胞的形态

刚刚分离提取出来未贴壁的卵巢颗粒细胞呈圆形, 卵巢颗粒细胞接种 24 h 内开始贴壁生长, 细胞形态发生改变, 呈梭形或星状突起, 与神经元细胞样的突触类似, 卵巢颗粒细胞在培养 48 h 时, 其贴壁率达 80% 以上 (图 1)。

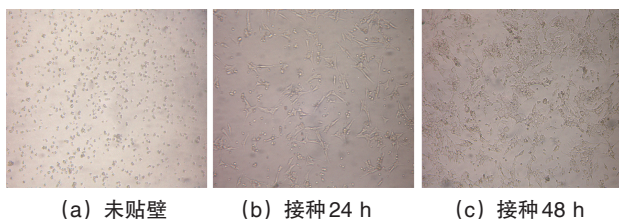


图 1 不同时间点体外培养人卵巢颗粒细胞的形态 (100×)
Fig. 1 Morphology of human ovarian granulosa cells cultured in vitro at different time points (100×)

2.2 PCOS 组与对照组患者卵巢颗粒细胞培养液中甾体激素水平的比较

PCOS 组患者卵巢颗粒细胞培养液中睾酮水平显著升高 ($P < 0.05$), 孕酮水平显著下降 ($P < 0.05$), 有统计学意义。两组患者卵巢颗粒细胞培养液中 E_2 水平相近 ($P > 0.05$), 差异无统计学意义 (图 2)。说明 PCOS 组患者卵巢颗粒细胞 T 分泌亢进, P 作为 T 合成的前体物质消耗增多, P 水平降低。

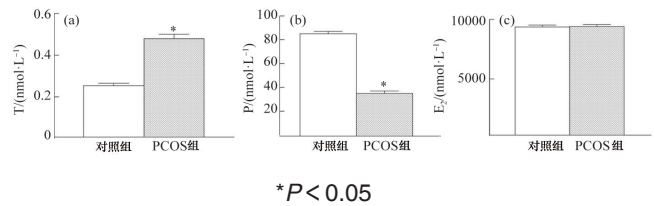


图 2 PCOS 组与对照组患者卵巢颗粒细胞培养液中甾体激素水平比较

Fig. 2 Levels of steroid hormones in the culture fluid of ovarian granulosa cells from PCOS group and control group

2.3 PCOS 组与对照组患者卵巢颗粒细胞糖摄取比较

用 2-NBDG 检测两组患者卵巢颗粒细胞的葡萄糖摄取情况, PCOS 组患者较对照组患者卵巢颗粒细胞的荧光强度明显降低 (0.0836 ± 0.00306 vs 0.11414 ± 0.01108 , $P < 0.05$), 说明 PCOS 组患者卵巢颗粒细胞存在葡萄糖摄取障碍 (图 3)。

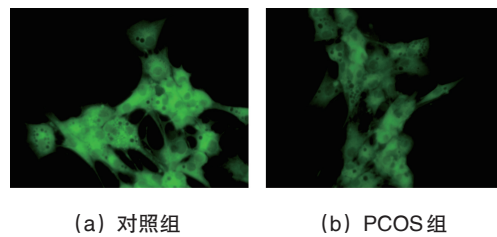


图 3 PCOS 组与对照组患者卵巢颗粒细胞糖摄取比较 (400×)
Fig. 3 Glucose uptake of ovarian granulosa cells from the PCOS group and control group (400×)

2.4 PCOS 组与对照组患者卵巢颗粒细胞中 *c-fos* 和 *CYP17* 的表达

Western Blot 结果显示, 与对照组相比, PCOS 组卵巢颗粒细胞中 *c-fos* 基因表达水平明显降低 ($P < 0.05$), 但 PCOS 组 *CYP17* 表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。该变化可能是 PCOS 卵巢颗粒细胞中低表达的 *c-fos* 基因对 *CYP17* 的抑制作用减弱的结果 (图 4)。

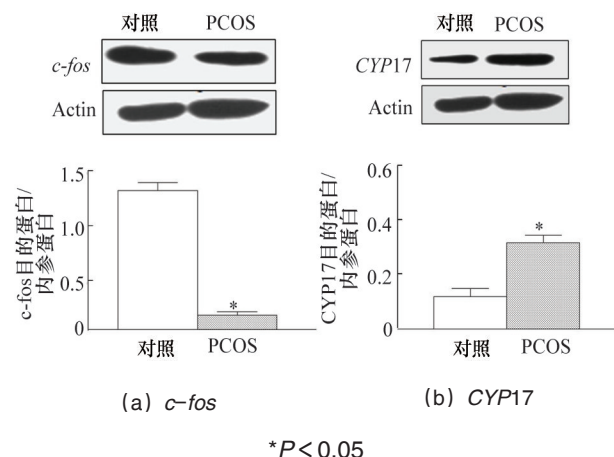


图 4 对照组和 PCOS 组卵巢颗粒细胞 *c-fos* 和 *CYP17* 的表达量

Fig. 4 Expression of *c-fos* and *CYP17* in ovarian granulosa cells from control group and PCOS group

3 讨论

PCOS是一种卵巢类固醇激素分泌异常的复杂遗传异质性疾病^[5]。卵巢自身功能异常与PCOS的发生密切相关。颗粒细胞是卵巢重要的功能细胞。正常情况下,颗粒细胞是非雄激素分泌细胞,不合成雄激素。但PCOS状态下,卵巢功能出现异常,卵巢颗粒细胞功能可能发生改变,向卵泡膜细胞转化,具有合成雄激素的功能,这可能是PCOS卵巢高雄激素血症的病理生理因素之一。*CYP17*是雄激素合成的关键酶,对正常卵巢的研究发现,*CYP17*在颗粒细胞中不表达,因此正常颗粒细胞不分泌雄激素^[4]。*c-fos*基因是细胞核转录因子激活蛋白(AP-1)的主要成分,研究发现*c-fos*对*CYP17*的表达及雄激素合成的功能有负反馈调节效应。在颗粒细胞层*c-fos*基因表达显著增高,进而抑制了*CYP17*基因的表达及雄激素的合成^[4]。在卵泡膜细胞的研究中发现,沉默*c-fos*基因后*CYP17*表达增加,雄激素生成增多^[6]。因此推测PCOS卵巢颗粒细胞功能发生变化,具有了分泌雄激素的功能,而其*c-fos/CYP17*表达的异常可能是其功能向卵泡膜细胞转化的重要因素,与PCOS卵巢雄激素分泌增多的发生密切相关。

本研究发现PCOS患者卵巢颗粒细胞与正常组相比存在糖代谢异常及雄激素分泌过多,说明PCOS患者卵巢颗粒细胞存在功能异常,且其具有合成雄激素的功能。研究已经证实,PCOS中卵巢雄激素过多和胰岛素抵抗二者相互促进,形成恶性循环^[7]。其可能机制是卵巢*CYP17*异常高表达升高了17,20-裂解酶的活性,进而增加雄激素的合成,胰岛素受体β链(IR-β)的丝氨酸磷酸化抑制IR-β的酪氨酸磷酸化,可引起胰岛素抵抗^[8]。此外,颗粒细胞还能够将卵巢合成过多的雄激素在芳香化酶(*CYP19*)的作用下转化为雌酮,雌酮又刺激垂体,使垂体对下丘脑分泌的GnRH敏感性增强,LH分泌过多,LH再刺激卵泡膜细胞和间质细胞分泌过多雄激素,形成一个恶性循环^[9]。因此,PCOS患者卵巢颗粒细胞雄激素分泌过多可能导致其胰岛素抵抗发生,这与实验结果一致的。

*CYP17*是合成雄激素的关键酶,在对正常卵巢组织*c-fos*基因和*CYP17*基因进行的免疫组织化学研究中发现,在颗粒细胞层*c-fos*基因的高活性抑制了*CYP17*基因的表达,使*CYP17*不表达,不能合成雄激素^[10]。而PCOS卵巢颗粒细胞具有分泌雄激素功能,因此*CYP17*应该在PCOS颗粒细胞中表达。本研究结果表明,PCOS患者卵巢颗粒细胞不仅表达*CYP17*,而且与正常对照组相比*CYP17*表达显著增高,高表达的*CYP17*可使雄激素的合成增加。同时PCOS患者卵巢颗粒细胞*c-fos*的表达明显下降,这与二者之间的负反馈调节关系一致。这些结果提示,PCOS患者卵巢功能存在异常,使其颗粒细胞功能同时发生改变,*c-fos*表达异常降低,对*CYP17*的抑制作用减弱,通过某种分子机制使*CYP17*的表达异常增加,进而使颗粒细胞具有了合成雄激素的功能,且使雄激素合成异常增多。

本研究结果提示,PCOS患者卵巢颗粒细胞中*c-fos*与*CYP17*的异常表达与其雄激素分泌过多的发生关系密切,但确切的作用机制仍有待进一步深入研究。

4 结论

PCOS患者卵巢颗粒细胞雄激素分泌异常增高,并存在糖代谢异常。PCOS患者颗粒细胞*CYP17*基因表达升高,*c-fos*基因表达降低,提示PCOS颗粒细胞功能发生异常变化,低表达的*c-fos*基因可能降低了对*CYP17*基因的抑制作用,使*CYP17*高表达,进而使颗粒细胞雄激素分泌异常增高,可能是PCOS患者卵巢雄激素分泌增多的原因之一。

参考文献(References)

- [1] Manco M, Castagneto-Gissey L, Arrighi E, et al. Insulin dynamics in young women with polycystic ovary syndrome and normal glucose tolerance across categories of body mass index[J]. PLoS One, 2014, 9(4): e92995.
- [2] Sun J, Zhao J M, Ji R, et al. Effects of electroacupuncture of "Guanyuan" (CV 4)-"Zhongji" (CV 3) on ovarian P450 aom and P450c 17alpha expression and relevant sex hormone levels in rats with polycystic ovary syndrome[J]. Acupuncture Research, 2013, 38(6): 465-472.
- [3] Jones M R, Chazenbalk G, Xu N, et al. Steroidogenic regulatory factor FOS is underexpressed in polycystic ovary syndrome (PCOS) adipose tissue and genetically associated with PCOS susceptibility[J]. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2012, 97(9): E1750- E1757.
- [4] Patel S S, Beshay V E, Escobar J C, et al. 17α-Hydroxylase (*CYP17*) expression and subsequent androstenedione production in the human ovary[J]. Reproductive Sciences, 2010, 17(11): 978-986.
- [5] Ecklund L C, Usadi R S. Endocrine and reproductive effects of polycystic ovarian syndrome[J]. Obstetrics and Gynecology Clinics of North America, 2015, 42(1): 55-65.
- [6] Hofland J, Steenbergen J, Hofland L J, et al. Protein kinase C-induced activin A switches adrenocortical steroidogenesis to aldosterone by suppressing *CYP17A1* expression[J]. American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism, 2013, 305(6): E736-E744.
- [7] Baptiste C G, Battista M C, Trottier A, et al. Insulin and hyperandrogenism in women with polycystic ovary syndrome[J]. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2010, 122(1-3): 42-52.
- [8] Dewailly D, Hieronimus S, Mirakian P, et al. Polycystic ovary syndrome (PCOS)[J]. Annales D'endocrinologie, 2010, 71(1): 8-13.
- [9] Abbott D H, Bacha F. Ontogeny of polycystic ovary syndrome and insulin resistance in utero and early childhood[J]. Fertility and Sterility, 2013, 100(1): 2-11.
- [10] Hoang Y D, McTavish K J, Chang R J, et al. Paracrine regulation of theca androgen production by granulosa cells in the ovary[J]. Fertility and Sterility, 2013, 100(2): 561-567.

(责任编辑 吴晓丽)