

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research大豆异黄酮通过调节 *miR-29a-3p*/IGF1
分子轴缓解大鼠多囊卵巢综合征的研究Research on soyisoflavones alleviate polycystic ovary syndrome in rats by
modulating the *miR-29a-3p*/IGF1 molecular axis雷承泳, 李 丽, 罗朝霞,
黄 颖, 冯 清, 连 瑜(赣州市人民医院 生殖医学科, 江西 赣州
341000)LEI Cheng-yong, LI Li,
LUO Zhao-xia, HUANG Ying,
FENG Qing, LIAN Yu(Department of Reproductive Medicine,
Ganzhou People's Hospital, Ganzhou
341000, Jiangxi Province, China)作者简介: 雷承泳(1988-), 男, 主管检验师,
主要从事生殖医学方面的临床诊疗
工作

通信作者: 雷承泳

MP: 15216184995

E-mail: ley1005ley@163.com

摘要:目的 探讨大豆异黄酮(SIF)通过调节 *miR-29a-3p*/胰岛素样生长因子1(IGF1)分子轴缓解大鼠多囊卵巢综合征(PCOS)的机制。方法 将雌性SD大鼠分为正常组、模型组和实验组,每组12只。模型组和实验组均灌胃来曲唑诱导构建PCOS大鼠模型。待建模成功后,正常组和模型组均灌胃给予 $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 羧甲基纤维素钠溶液,实验组灌胃给予 $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ SIF。3组大鼠每天给药1次,连续21 d。用原位末端转移酶标记法检测卵巢组织中颗粒细胞的凋亡率,用酶联免疫吸附试验法检测血清性激素水平,用实时荧光定量聚合酶链反应检测卵巢组织中 *miR-29a-3p* 和 *IGF1* 的表达水平,用免疫组化法检测卵巢组织中 IGF1 阳性表达水平。取PCOS模型大鼠的卵巢颗粒细胞,分为空白组(正常培养)、实验组($100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ SIF)、*miR-29a-3p* 组(转染 *miR-29a-3p inhibitor* 后,给予 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ SIF培养)和 IGF1 组(转染 *miR-29a-3p inhibitor* 和 *si-IGF1* 后,给予 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ SIF培养)。用线粒体膜电位法检测卵巢颗粒细胞的凋亡情况,用蛋白质印迹法检测凋亡相关蛋白的表达水平。**结果** 在动物实验中,实验组、模型组和正常组的细胞凋亡率分别为 $(16.14\pm4.09)\%$ 、 $(23.75\pm5.68)\%$ 和 $(10.83\pm3.54)\%$,黄体生成素水平分别为 (26.81 ± 5.99) 、 (41.55 ± 9.84) 和 $(17.63\pm3.19)\text{ mU}\cdot\text{mL}^{-1}$,促卵泡激素水平分别为 (51.09 ± 8.72) 、 (41.66 ± 9.87) 和 $(67.91\pm18.58)\text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$,*miR-29a-3p* 相对表达水平分别为 0.89 ± 0.08 、 0.47 ± 0.06 和 1.00 ± 0.11 ,*IGF1* mRNA 相对表达水平分别为 1.42 ± 0.39 、 2.36 ± 0.54 和 1.00 ± 0.07 ,IGF1 阳性表达水平分别为 1.37 ± 0.31 、 1.98 ± 0.41 和 1.00 ± 0.12 。实验组和正常组的上述指标与模型组比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。在细胞实验中,实验组、*miR-29a-3p* 组、IGF1 组和空白组的线粒体膜电位分别为 1.28 ± 0.13 、 0.66 ± 0.05 、 1.47 ± 0.19 和 0.54 ± 0.06 ,B淋巴细胞瘤-2基因相关X蛋白相对表达水平分别为 0.73 ± 0.06 、 0.97 ± 0.11 、 0.62 ± 0.07 和 1.00 ± 0.08 ,B淋巴细胞瘤-2基因蛋白相对表达水平分别为 1.74 ± 0.23 、 1.14 ± 0.18 、 2.11 ± 0.37 和 1.00 ± 0.05 。实验组和IGF1组的上述指标与 *miR-29a-3p* 组比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。**结论** SIF可能通过调控 *miR-29a-3p*/IGF1 通路介导卵巢细胞的凋亡过程来延缓大鼠PCOS的进展。

关键词:大豆异黄酮;胰岛素样生长因子1;多囊卵巢综合征;凋亡;激素

DOI:10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.06.017

中图分类号:R285.5

文献标志码:A

文章编号:1001-6821(2025)06-0840-06

Abstract: Objective To investigate the mechanism of soyisoflavones (SIF) alleviate the rats with polycystic ovary syndrome (PCOS) by regulating the *miR-29a-3p*/insulin-like growth factor 1 (IGF1) molecular axis. **Methods** The female SD rats were divided into normal,

model and experimental groups, with 12 rats in each group. The model and experimental groups were induced with gavage letrozole to construct the PCOS rat model. After successful modeling, the normal and model groups were given $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ cellulose sodium carboxymethyl by gavage, and the experimental group was given $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ SIF by gavage. Three groups were treated for 21 d with once a day. The apoptosis rate of ovarian tissues was detected by TdT-mediated dUTP nick-end labeling, the serum sex hormone levels were detected by enzyme-linked immunosorbent assay, the expression levels of *miR-29a-3p* and *IGF1* were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, and the positive expression level of *IGF1* was detected by immunohistochemistry in ovarian tissues. Ovarian granulosa cells from PCOS model rats were divided into blank group (normal culture), experimental group ($100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ SIF), *miR-29a-3p* group (after transfection with *miR-29a-3p* inhibitor, $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ SIF culture was given) and *IGF1* group (after transfection with *miR-29a-3p* inhibitor and *si-IGF1*, $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ SIF culture was given). Apoptosis of ovarian granulosa cells was measured by mitochondrial membrane potential analysis, and the expression level of apoptosis-related proteins was detected by Western blotting.

Results In the animal experiments, the apoptosis rates of experimental, model and normal groups were $(16.14 \pm 4.09)\%$, $(23.75 \pm 5.68)\%$ and $(10.83 \pm 3.54)\%$; the luteinizing hormone levels were (26.81 ± 5.99) , (41.55 ± 9.84) and $(17.63 \pm 3.19) \text{ mU} \cdot \text{mL}^{-1}$; the follicle stimulating hormone levels were (51.09 ± 8.72) , (41.66 ± 9.87) and $(67.91 \pm 18.58) \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$; the relative expression levels of *miR-29a-3p* were 0.89 ± 0.08 , 0.47 ± 0.06 and 1.00 ± 0.11 ; the relative expression levels of *IGF1* mRNA were 1.42 ± 0.39 , 2.36 ± 0.54 and 1.00 ± 0.07 ; the positive expression levels of *IGF1* were 1.37 ± 0.31 , 1.98 ± 0.41 and 1.00 ± 0.12 , respectively. The differences of above indexes in the experimental and normal groups were statistically different from those in the model group (all $P < 0.05$). In the cell experiments, the mitochondrial membrane potentials of the experimental, *miR-29a-3p*, *IGF1* and blank groups were 1.28 ± 0.13 , 0.66 ± 0.05 , 1.47 ± 0.19 and 0.54 ± 0.06 ; the relative expressions levels of the B-cell lymphoma-2-associated X protein were 0.73 ± 0.06 , 0.97 ± 0.11 , 0.62 ± 0.07 and 1.00 ± 0.08 ; the relative expression levels of B-cell lymphoma-2 were 1.74 ± 0.23 , 1.14 ± 0.18 , 2.11 ± 0.37 and 1.00 ± 0.05 , respectively. The differences of above indexes in the experimental and *IGF1* groups were statistically different from those in the *miR-29a-3p* group (all $P < 0.05$).

Conclusion SIF may delay the progression of PCOS rats by regulating *miR-29a-3p/IGF1* pathway to mediate the apoptotic process in ovarian cells.

Key words: soyisoflavones; insulin-like growth factor 1; polycystic ovary syndrome; apoptosis; hormone

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 是一种以代谢异常、胰岛素抵抗和高雄激素等为主要病理特征的内分泌代谢紊乱性疾病^[1], 是引起女性不孕的重要原因之一, 发病率可达 $5\% \sim 15\%$, 严重威胁女性的身心健康^[2]。大豆异黄酮 (soyisoflavones, SIF) 是一种常见的植物雌激素, 其药理作用与雌激素相似, 同时, SIF 还具有芳香化酶抑制作用, 会影响雄激素向雌激素的转化^[3]。目前, 关于 SIF 的研究多集中于其对心血管疾病、脑血管疾病、热应激、癌症、免疫系统疾病的防治作用^[4]。本实验旨在探讨 SIF 通过调节 *miR-29a-3p/胰岛素样生长因子 1 (insulin-like growth factor 1, IGF1)* 分子轴来缓解 PCOS 的相关作用机制。

材料与方法

1 材料

动物 SPF 级雌性 SD 大鼠, 鼠龄 6~7 周, 体质

量 200~210 g, 江西中医药大学提供。动物许可证号: SCXK(赣)2023-0001。本实验经赣州市人民医院动物伦理委员会批准[伦理批号: 伦审科 2024 第(9)号]。

细胞 人胚肾 293T 细胞, 购自上海酶联生物科技有限公司。

药品与试剂 SIF, 规格: 每瓶 200 mg, 纯度: $\geq 98\%$, 批号: 227087, 来曲唑, 规格: 每瓶 50 mg, 纯度: 99.68% , 批号: 115372, 均由美国 TargetMol 公司生产; 羧甲基纤维素钠 (cellulose sodium carboxymethyl, CMC-Na), 规格: 每瓶 50 g, 纯度: $\geq 99\%$, 批号: 151826, 美国 MedChemExpress 公司生产。Lipofectamin 2000 试剂、*IGF1* 一抗、B 淋巴细胞瘤-2 基因 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 一抗、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2-associated X protein, Bax) 一抗、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate

dehydrogenase, GAPDH) 一抗、辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠免疫球蛋白 G 抗体, 均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 抗缪勒氏管激素 (anti - Mullerian hormone, AMH)、睾酮 (testosterone, T)、雌二醇 (estradiol, E2)、促卵泡激素 (follicle - stimulating hormone, FSH)、黄体生成素 (luteinizing hormone, LH) 酶联免疫吸附试验 (enzyme - linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒, 均购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司。

仪器 iMark680 多功能酶标仪, 美国 Bio - Rad 公司产品; BX61 荧光显微镜, 日本 Olympus 公司产品; NovoCyte3000 流式细胞仪, 美国安捷伦科技公司产品; Applied Biosystems 实时荧光定量聚合酶链反应 (real - time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, qRT - PCR) 仪, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品。

2 实验方法

2.1 动物实验

2.1.1 模型构建^[5]

大鼠适应性喂养 1 周后, 按 $1\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量灌胃给予 $0.2\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的来曲唑溶液, 每日 1 次, 连续给药 21 d, 在造模的第 21 天后对大鼠进行阴道涂片采集, 监测大鼠的动情周期变化, 连续 11 d, 以动情周期紊乱表示大鼠 PCOS 模型制备成功。

2.1.2 动物分组与给药方法

取 36 只大鼠随机分为正常组、模型组和实验组, 每组 12 只。模型组和实验组按“2.1.1”的方法进行造模, 正常组不造模。

待造模完成后, 实验组灌胃给予 $100\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ SIF, 模型组和正常组均灌胃给予等量 CMC - Na 溶液。3 组大鼠每天给药 1 次, 连续 21 d。

2.1.3 苏木精 - 伊红 (hematoxylin - eosin, HE) 染色法检测卵巢病理组织的变化情况^[6-7]

取大鼠卵巢组织, 用 4% 多聚甲醛溶液固定 48 h, 制作石蜡切片, HE 染色后, 在显微镜下观察卵巢组织的形态和结构变化。

2.1.4 原位末端转移酶标记法 (TdT - mediated dUTP nick - end labeling, TUNEL) 测定卵巢组织中颗粒细胞的凋亡情况^[8]

取大鼠卵巢组织切片并脱水后, 加入蛋白酶 K 工作液, 孵育 20 min 后清洗, 再加入 TUNEL 工作液, 孵育 1 h 后清洗, 染核后, 在光镜下观察并计数。

2.1.5 ELISA 法测定激素水平^[9]

大鼠腹主动脉取血, 离心后, 置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 严格按照试剂盒说明书的步骤进行操作, 用 ELISA 法检

测血清 AMH、T、E2、FSH 和 LH 水平。

2.1.6 qRT - PCR 测定 *miR - 29a - 3p*/*IGF1* mRNA 的表达水平^[10]

用总 RNA 提取试剂提取卵巢组织的总 RNA, 逆转录互补 RNA, 进行扩增。分别以 *U6* 和 *GAPDH* 为内参, 用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 *miR - 29a - 3p* 和 *IGF1* mRNA 的相对表达水平。

2.1.7 免疫组化法测定 *IGF1* 阳性表达水平^[11]

卵巢组织冰冻切片, 复温、水化、透化处理, *IGF1* 一抗 (1:100) 孵育过夜, 二抗孵育 50 min, 显色、复染、脱水及封片, 在显微镜下观察 *IGF1* 的阳性表达情况。

2.2 细胞实验

2.2.1 细胞分离与培养^[12]

取按“2.1.1”中方法造模成功的 SD 大鼠的卵巢组织, 置于无血清杜氏培养基 (Dulbecco's modified eagle medium, DMEM) - F12 培养基中, 穿刺卵泡以释放卵巢颗粒细胞。将卵巢颗粒细胞和 293T 细胞均置于含有 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 及 1% 链霉素和青霉素的 DMEM - F12 培养基中, 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 的培养箱中培养。待细胞生长密度达 80% ~ 90%, 按 1:3 比例, 进行传代。

2.2.2 细胞分组与处置方法^[13]

将对数生长期卵巢颗粒细胞随机分为空白组、实验组、*miR - 29a - 3p* 组和 *IGF1* 组。空白组给予正常培养; 实验组给予 $100\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ SIF 处理; *miR - 29a - 3p* 组转染 *miR - 29a - 3p inhibitor* 后, 并给予 $100\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ SIF 培养; *IGF1* 组转染 *miR - 29a - 3p inhibitor* 和 *si - IGF1* 后, 并给予 $100\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ SIF 培养。转染方法: 将卵巢颗粒细胞 (1×10^6 个) 接种至 6 孔培养板, 待细胞汇合度达 70% ~ 80% 时, 用脂质体 Lipofectamin 2000 分别与 *miR - 29a - 3p inhibitor*、*si - IGF1* 置于 DMEM - F12 培养基 (不含血清和抗菌药物) 稀释, 室温条件下孵育 5 min 后混合, 反复吹吸数次, 室温静置 20 min, 将混合液加入 6 孔培养板中, 继续培养 6 h, 弃去培养基, 加入新鲜的 DMEM 完全培养基继续培养 24 h 后, 收集对数生长期细胞进行后续处理。

2.2.3 双荧光素酶报告基因实验测定 *miR - 29a - 3p* 与 *IGF1* 靶向关系^[14]

用 Target scan 7.2 预测 *IGF1* 和 *miR - 29a - 3p* 的结合位点。分别构建野生型 (wide type, WT) - *IGF1* 和突变型 (mutant type, MUT) - *IGF1*, 转染前 24 h, 将人胚肾系 293T 细胞 (0.4×10^5 个) 均匀铺至 24 孔培养板中, 保证转染时细胞汇合度在 50% ~ 60%, 分别

与 *miR-29a-3p inhibitor*、*NC-inhibitor* 共转染,48 h 后,收集细胞,分别记为 *miR-29a-3p inhibitor* 组和 *NC-inhibitor* 组,加入裂解液,离心,检测荧光素酶活性。

2.2.4 JC-1 线粒体膜电位法测定卵巢颗粒细胞的凋亡情况^[15]

根据 JC-1 线粒体膜电位试剂盒说明书的步骤进行操作,用流式细胞仪在 488 nm 处激发 JC-1,用 580 nm 的长通滤波器检测。线粒体膜电位 ($\Delta\Psi_m$) 水平用聚合物/单体的相对比例表示。

2.2.5 蛋白质印迹法检测凋亡相关蛋白 Bax 及 Bcl-2 的表达水平^[16]

收集各组的卵巢颗粒细胞,加入裂解液,提取细胞蛋白,用二喹啉甲酸法检测蛋白浓度,取变性蛋白进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳,将分离的蛋白凝胶转移至聚偏二氟乙烯膜,室温封闭 2 h,加入一抗 (1:1 000),4 ℃ 孵育过夜,洗涤后加入二抗 (1:1.0 × 10⁴),室温孵育 1 h,洗涤后滴加增强型化学发光试剂,于暗室内曝光显影,以 GAPDH 为内参蛋白,用 Image J 软件计算分析目标条带的灰度值。

3 统计学处理

用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组间比较用独立样本 *t* 检验。

结 果

1 动物实验结果

1.1 SIF 对大鼠卵巢组织病理情况和凋亡率的影响

实验组给予 100 mg · kg⁻¹ SIF,模型组和正常组均给予等量 CMC-Na 溶液。

HE 染色和阴道涂片结果显示:正常组未观察到明显病理现象,动情周期规律;模型组出现典型多囊改变,动情间期持续;实验组病理情况有所减轻,动情周期逐渐恢复正常。结果见图 1。

TUNEL 染色结果显示:正常组、模型组和实验组的卵巢颗粒细胞凋亡率分别为 (10.83 ± 3.54)%、

(23.75 ± 5.68)% 和 (16.14 ± 4.09)%,模型组的卵巢颗粒细胞凋亡率与实验组和正常组比较,在统计学上差异均有统计学意义 (均 *P* < 0.05)。

1.2 SIF 改善 PCOS 大鼠异常性激素水平

模型组与正常组相比,大鼠血清中 T、AMH 和 LH 水平均显著升高,FSH 和 E2 水平均显著降低 (均 *P* < 0.05);实验组与模型组相比,大鼠血清中 T、AMH 和 LH 水平均显著降低,FSH 和 E2 水平均显著升高 (均 *P* < 0.05)。结果见表 1。

1.3 SIF 改变 PCOS 大鼠卵巢组织中 *miR-29a-3p*/*IGF1* 的表达水平

正常组、模型组和实验组的 *miR-29a-3p* 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.11、0.47 ± 0.06 和 0.89 ± 0.08, *IGF1* mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.07、2.36 ± 0.54 和 1.42 ± 0.39, *IGF1* 阳性表达水平分别为 1.00 ± 0.12、1.98 ± 0.41 和 1.37 ± 0.31,模型组的上述指标与实验组和正常组比较,在统计学上差异均有统计学意义 (均 *P* < 0.05), *IGF1* 阳性情况结果,见图 2。

2 细胞实验结果

2.1 验证 *miR-29a-3p*/*IGF1* 靶向调控关系

NC-inhibitor 组和 *miR-29a-3p inhibitor* 组与 *IGF1* WT 共转染的荧光素酶活性分别为 1.00 ± 0.06 和 1.56 ± 0.19,与 *IGF1* MUT 共转染的荧光素酶活性

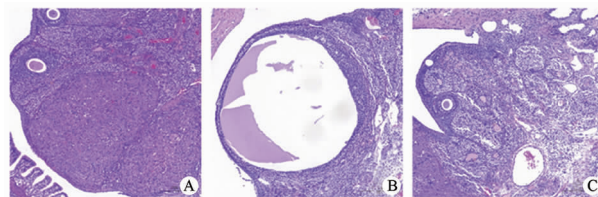


图 1 用苏木精-伊红 (HE) 染色法观察大鼠卵巢组织病理的变化 (×50)

Figure 1 Changes of ovarian histopathology were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining (×50)

A: Normal group, cellulose sodium carboxymethyl (CMC-Na); B: Model group, CMC-Na; C: Experimental group; 100 μg · L⁻¹ soyisoflavones.

表 1 3 组大鼠血清性激素水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of serum sex hormone levels among three groups of rats ($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	LH (mU · mL ⁻¹)	FSH (pg · mL ⁻¹)	T (ng · mL ⁻¹)	E2 (pg · mL ⁻¹)	AMH (pg · mL ⁻¹)
Normal	12	17.63 ± 3.19	67.91 ± 18.58	3.05 ± 0.68	43.29 ± 7.62	662.85 ± 152.76
Model	12	41.55 ± 9.84 *	41.66 ± 9.87 *	4.02 ± 0.93 *	34.46 ± 6.53 *	1 087.98 ± 216.63 *
Experimental	12	26.81 ± 5.99 #	51.09 ± 8.72 #	3.29 ± 0.44 #	40.96 ± 7.18 #	867.58 ± 154.02 #

LH: Luteinizing hormone; FSH: Follicle-stimulating hormone; T: Testosterone; E2: Estradiol; AMH: Anti-müllerian hormone; Compared with normal group,

* *P* < 0.05; Compared with model group, # *P* < 0.05.

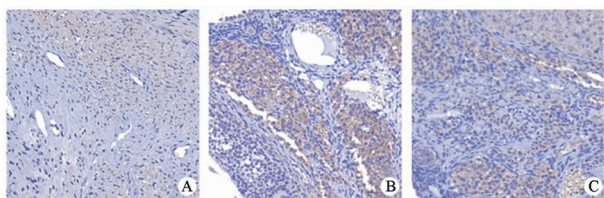


图2 用免疫组化法检测3组大鼠卵巢组织胰岛素样生长因子1的阳性表达情况($\times 200$)

Figure 2 Positive expression of insulin-like growth factor 1 (IGF1) in the ovarian tissues among three groups of rats detected by immunohistochemistry ($\times 200$)

A - C refer to figure 1.

分别为 1.00 ± 0.07 和 1.04 ± 0.06 , IGF1 mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.06 和 3.13 ± 0.74 , IGF1 相对蛋白表达水平分别为 1.00 ± 0.08 和 2.67 ± 0.62 ; miR-29a-3p inhibitor 组与 NC-inhibitor 组比较,与 IGF1 WT 共转染的荧光素酶活性、IGF1 mRNA 及蛋白相对表达水平均明显增加(均 $P < 0.05$),与 IGF1 MUT 共转染的荧光素酶活性无显著性差异($P > 0.05$)。

2.2 SIF 调控 miR-29a-3p/IGF1 抑制 PCOS 大鼠卵巢颗粒细胞凋亡

空白组给予正常培养;实验组给予 $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ SIF 处理;miR-29a-3p 组转染 miR-29a-3p inhibitor 后,并给予 $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ SIF 培养;IGF1 组转染 miR-29a-3p inhibitor 和 si-IGF1 后,并给予 $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ SIF 培养。

如图3所示:空白组、实验组、miR-29a-3p 组和 IGF1 组的 JC-1 线粒体膜电位分别为 0.54 ± 0.06 、

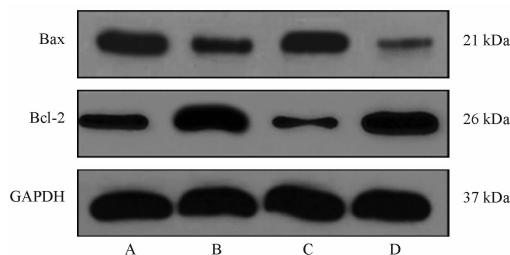


图3 用蛋白质印迹法检测各组卵巢颗粒细胞中凋亡相关蛋白的表达情况

Figure 3 Expression of apoptosis-related proteins in ovarian granulosa cells of each group detected by protein western blotting
A: Blank group, normal culture; B: Experimental group, $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ SIF; C: miR-29a-3p group, transfected with miR-29a-3p inhibitor + $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ SIF; D: IGF1 group, transfected with miR-29a-3p inhibitor and si-IGF1 + $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ SIF; Bcl-2: B-cell lymphoma-2; Bax: Bcl-2-associated X protein; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

1.28 ± 0.13 、 0.66 ± 0.05 和 1.47 ± 0.19 , Bax 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.08 、 0.73 ± 0.06 、 0.97 ± 0.11 和 0.62 ± 0.07 , Bcl-2 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.05 、 1.74 ± 0.23 、 1.14 ± 0.18 和 2.11 ± 0.37 ;实验组的上述指标与空白组和 miR-29a-3p 组比较,IGF1 组的上述指标与 miR-29a-3p 组比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

讨 论

截至目前,PCOS 的病理机制尚未阐明,认为其与肥胖、代谢紊乱、氧化应激、卵巢间质纤维化、炎症及肠道菌群紊乱等关系密切。目前,PCOS 缺乏有效的药物治疗手段,而中药复方、单体及其化合物在缓解氧化应激损伤、改善 PCOS 预后等方面的疗效显著,其中 SIF 作为提高抗氧化酶活性、降低氧化应激损伤的黄酮类化合物代谢产物之一,具有治疗 PCOS 的潜力^[17-18]。已有研究报道,SIF 可以通过激活核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)/血红素加氧酶 1(heme oxygenase-1, HO-1) 通路,抑制氧化应激状态,减轻 PCOS 大鼠的卵巢组织损伤^[19]。张萍等^[20]研究发现,抑制 PCOS 大鼠血清 T 和 LH 水平,升高 E2 和 FSH 水平,能够显著抑制 PCOS 大鼠卵巢组织疾病进展。本研究发现,PCOS 大鼠处于动情周期的时间显著增加,性激素水平出现异常变化,提示 PCOS 模型大鼠构建成功,而给予 SIF 治疗后,可以显著改善大鼠内分泌紊乱情况,调节性激素水平,提示 SIF 对 PCOS 模型大鼠具有改善效果,这可能与 SIF 同时具有雌激素和抗氧化特性的双重平衡作用有关。

miRNA 能通过引发 mRNA 的降解或转录后的基因沉默来参与 PCOS 的发生发展。miR-29a-3p 作为 miR-29 家族成员之一,参与机体代谢紊乱的调控^[21]。LIU 等^[22]研究显示,miR-29a 在高脂血症小鼠血清和尿液中表达水平显著降低,敲低 miR-29a 可以促进其肥胖和胰岛素抵抗状态。IGF1 是一种具有降血糖、促生长等胰岛素样作用的小分子^[23-24]。本研究发现:miR-29a-3p 与 IGF1 存在靶向关系;加入 miR-29a-3p 抑制药可以显著降低 SIF 处理对诱导的卵巢颗粒细胞中凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 表达的抑制作用,提高凋亡率,而敲低 IGF1 则起到相反的作用,这提示 SIF 可能通过上调 miR-29a-3p 表达水平和靶向下调 IGF1 的表达水平来发挥保护 PCOS 大鼠卵巢功能的作用,与颜秀敏等^[25]报道结果类似。

本研究提示:SIF能够抑制PCOS卵巢颗粒细胞凋亡,使其发挥正常功能,从而有益于卵泡发育,其途径可能与调控 *miR-29a-3p*/IGF1 分子轴有关。

参考文献:

- [1] 俞瑾,吴阳,朱静,等. 补肾活血化痰方治疗肾虚血瘀痰阻证多囊卵巢综合征的临床疗效观察[J]. 世界中医药,2023,18(17):2498—2503,2508.
- [2] 李冰,刘琳,赫欣. 长链非编码RNA GNAQ-ASI在高雄激素多囊卵巢综合征中的机制研究[J]. 中国临床药理学杂志,2024,40(8):1170—1174.
- [3] 宋娜,苏东峰,刘晓燕,等. 大豆异黄酮对2型糖尿病围绝经期模型大鼠氧化应激损伤的保护作用及其机制[J]. 吉林大学学报(医学版),2019,45(6):1310—1314.
- [4] 余强,郭传勇. 大豆异黄酮药理作用及其临床应用[J]. 世界临床药物,2018,39(9):643—646.
- [5] 张莘悦,陆聪,郑慧丽,等. 基于微生物组学研究枸杞叶对来曲唑诱导PCOS小鼠的干预作用[J]. 药学报,2024,59(7):2030—2040.
- [6] 杨宇琦,吴丽娜,孙克,等. 黄连素通过重塑肠道菌群和调节PI3K/AKT信号通路改善多囊卵巢综合征小鼠的作用机制研究[J]. 疑难病杂志,2024,23(3):352—359.
- [7] 陈志松,周艳红,黄吉成,等. 10-羟基癸酸对多囊卵巢综合征小鼠的作用及其机制[J]. 中国兽医学报,2024,44(2):341—347.
- [8] 高雪,康媛,滕月. 冷应激反应加重大鼠多囊卵巢综合征生殖功能障碍[J]. 河北医药,2024,46(3):345—348,353.
- [9] 张金融,李浩天,黄鸿铭,等. 基于生物信息学技术探讨左归丸治疗多囊卵巢综合征的机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2024,30(17):77—86.
- [10] 郑小妹,林叶飞,张韶琼,等. IGF1调控PI3K/AKT信号通路对卵巢癌细胞增殖和侵袭的影响[J]. 中国计划生育和妇产科,2023,15(4):32—37.
- [11] 张芳,丁怡,于潇,等. 补肾养精颗粒调控早发性卵巢功能不全模型大鼠卵巢颗粒细胞凋亡机制研究[J]. 山东中医药大学学报,2022,46(3):365—372,378.
- [12] 刘玉芳,陈玉林,周祖阳,等. *miR-221-3p*靶向BCL2L1调控小尾寒羊卵泡颗粒细胞凋亡[J]. 中国农业科学,2022,55(9):1868—1876.
- [13] 蔡睿,张浩,刘壮,等. 转录因子SOX3对卵巢颗粒细胞增殖和雌二醇分泌的影响[J]. 安徽医科大学学报,2024,59(3):371—376,383.
- [14] 邓方方,李继勇,张力,等. 血浆外泌体源性 *miR-29b-3p* 靶向IGF1对七氟醚后处理低氧/复氧心肌细胞损伤的作用[J]. 安徽医科大学学报,2023,58(9):1450—1457.
- [15] 胡俊,马智,张洪英,等. 白藜芦醇改善多囊卵巢综合征模型大鼠卵巢颗粒细胞线粒体功能和抑制凋亡的作用[J]. 重庆医科大学学报,2024,49(3):264—269.
- [16] 关菲菲,韩朝旭. 大蒜素对膜性肾病大鼠肾损伤的保护作用及机制研究[J]. 临床肾脏病杂志,2024,24(9):760—771.
- [17] 陈俊杰,许雪梅,李岩等. 八珍汤合白术附子汤对多囊卵巢综合征大鼠糖代谢及雌激素水平的调节作用[J]. 天津医药,2024,52(2):154—161.
- [18] 李三阳,金蓬勃,王秋红,等. 大豆异黄酮对先兆流产模型大鼠的保胎作用及机制研究[J]. 中国药房,2024,35(12):1482—1488.
- [19] 赵洪强,时敬爱,王金权,等. 大豆异黄酮调节Nrf2/HO-1信号通路对多囊卵巢综合征大鼠卵巢组织损伤的影响[J]. 中国药理学杂志,2023,58(8):699—707.
- [20] 张萍,王维斌,邵岩飞,等. 二陈汤对多囊卵巢综合征大鼠卵巢组织Bcl-2及Bax蛋白表达的影响[J]. 北京中医药大学学报,2020,43(11):941—950.
- [21] 方秀丽,王达颖,黄秀敏,等. 多囊卵巢综合征患者血清 *miR-29a*、*miR-143-3p* 表达及临床意义[J]. 中国医药导报,2023,20(30):108—112.
- [22] LIU T, SUN Y C, CHENG P, et al. Adipose tissue macrophage-derived exosomal *miR-29a* regulates obesity-associated insulin resistance [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 515(2):352—358.
- [23] 迪丽努尔·安外尔,热孜宛古丽·约麦尔,陆萍. 葛根素通过上调Wnt/ β -catenin信号通路改善化疗诱导的雌性生殖干细胞的氧化应激损伤和凋亡[J]. 中国医院用药评价与分析,2023,23(4):420—426,430.
- [23] 路璐,冯晓玲,马堃. 木犀草素通过AMPK/GSK3 β 通路调节多囊卵巢综合征大鼠内分泌的研究[J]. 中国临床药理学杂志,2024,40(23):3424—3428.
- [24] 万颖,杨彩虹,孟焕然,等. 金雀异黄酮对多囊卵巢综合征大鼠性激素水平的影响[J]. 中国临床药理学杂志,2021,37(5):556—559.
- [25] 颜秀敏,刘凯亮,高心雨等. 不同剂量大豆异黄酮对多囊卵巢综合征大鼠的干预效果研究[J]. 实用妇产科杂志,2020,36(8):626—630.

(收稿日期 2024-10-12)