

MIF 通过诱导自噬促进卵巢颗粒细胞的胰岛素抵抗

巩晓芸^{1,2}, 韩锐^{1,2}, 张于念^{1,2}, 腊晓琳^{1,2}

摘要 目的 在多囊卵巢综合征(PCOS)中探究巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)的表达及其对卵巢颗粒细胞的自噬与胰岛素抵抗(IR)的影响。方法 收集40例PCOS患者($n=40$)及20例对照女性(对照组, $n=20$)的卵泡液与卵巢颗粒细胞,其中PCOS包含伴IR者(PCOS伴IR组, $n=20$)与不伴IR者(PCOS不伴IR组, $n=20$)。采用ELISA法检测三组受试者卵泡液中MIF的表达,透射电子显微镜与Western blot法观察三组受试者颗粒细胞中的自噬空泡与自噬标志物微管相关蛋白1轻链3 II(LC3 II)/微管相关蛋白1轻链3 I(LC3 I)比值;体外培养人卵巢颗粒细胞系KNG,CCK-8法检测不同浓度MIF对颗粒细胞活性的影响;将KNG细胞分为4组:正常培养组(NC组)、MIF组、自噬抑制剂氯喹组(CQ组)和MIF+CQ组,Western blot法检测MIF对各组颗粒细胞中自噬相关蛋白LC3、自噬相关基因7(Atg7)、泛素结合蛋白(p62)及胰岛素信号通路中胰岛素受体底物-1(IRS-1)与葡萄糖转运蛋白4(GLUT4)表达及蛋白激酶B(Akt)蛋白磷酸化的影响,葡萄糖摄取实验检测MIF对各组颗粒细胞摄取葡萄糖能力的变化。结果 与对照组或PCOS不伴IR组相比,PCOS伴IR组患者的卵泡液中MIF的表达水平及颗粒细胞的自噬水平增加($P<0.05$, $P<0.01$);体外实验显示,MIF能够以浓度依赖性抑制颗粒细胞KNG的增殖活性;与NC组相比,MIF组与MIF+CQ组颗粒中LC3 II/LC3 I比值,Atg7蛋白表达增加($P<0.05$),而p62蛋白、IRS-1蛋白、Akt蛋白磷酸化水平和GLUT4蛋白表达水平及葡萄糖摄取能力均降低($P<0.05$),而与MIF组相比,MIF+CQ组颗粒中LC3 II/LC3 I比值与Atg7蛋白表达水平均降低($P<0.05$),而p62、IRS-1蛋白、Akt蛋白磷酸化水平和GLUT4蛋白表达水平及葡萄糖摄取能力均增加($P<0.05$)。结论 MIF可能通过上调颗粒细胞的自噬水平促进PCOS患者的IR发展,而抑制颗粒细胞的自噬则能改善MIF诱导IR。

关键词 多囊卵巢综合征;巨噬细胞迁移抑制因子;胰岛素

抵抗;颗粒细胞

中图分类号 R 715.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)10-1602-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.10.017

多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)是影响育龄女性最常见的内分泌疾病之一^[1]。而存在于PCOS患者外周组织和卵巢颗粒细胞中的胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)是PCOS的重要致病机制^[2]。卵巢颗粒细胞的IR可导致PCOS雄激素的生成和排卵的异常^[3]。同时,有研究^[4]证实,自噬对于卵巢正常功能的维持具有重要作用,但在PCOS的卵巢组织中则表现为过度的自噬,这可能是PCOS患者卵巢IR发展的原因之一^[3-4]。众所周知,IR与PCOS卵巢组织的低度慢性炎症有关^[5]。巨噬细胞迁移抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)作为最早被确认的促炎因子之一被发现在PCOS患者中呈现异常升高现象,且可能是造成患者IR发生的重要因素^[6-10]。而MIF能够在多种疾病中通过促进自噬来诱导疾病的进展^[11-12]。但在PCOS中,MIF能否通过调控颗粒细胞的自噬参与疾病的发生发展尚无相关研究报道。该研究通过收集PCOS患者的临床组织样本,并通过体外培养颗粒细胞以期阐明MIF在PCOS发生中的作用与相关机制。

1 材料与方法

1.1 研究对象 采集自2017年10月至2019年10月在新疆医科大学第一附属医院生殖医学中心接受体外受精或人卵胞质内单精子注射助孕患者的卵泡液和卵巢颗粒细胞,其中将40例PCOS患者按照胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)的稳态评估模型[$HOMA-IR = (\text{空腹胰岛素} \times \text{空腹血糖}) / 22.5$,分界点为3.15]分为PCOS伴IR组($n=20$)和PCOS不伴IR组($n=20$),并以糖化血红蛋白(hemoglobin A1c, HbA1c)水平辅助IR状态来确定。另取20例因单纯输卵管因素,且无IR的不育患者设为正常对照组(对照组)。PCOS的诊断标准遵循修订后的鹿特丹共识^[13]。上述受试者的纳入标准为:①年龄在

2022-06-10 接收

基金项目:省部共建中亚高发病成因与防治国家重点实验室开放课题项目(编号:SKL-HIDCA-2020-JZ10、SKL-HIDCA-2020-JZ4)

作者单位:¹新疆医科大学第一附属医院生殖医学中心,乌鲁木齐 830054

²省部共建中亚高发病成因与防治国家重点实验室,乌鲁木齐 830054

作者简介:巩晓芸,女,博士研究生;

腊晓琳,女,主任医师,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: 16107133@qq.com

20~35岁;②对照组既往月经周期规律,卵巢形态与储备功能正常;③近半年内未服用任何激素类药物或免疫调节性药物;④无子宫腺肌症、子宫肌瘤或子宫内膜异位症等疾病史;⑤无合并其他心、脑、血管、呼吸等系统的相关疾病;⑥既往无卵巢手术史。本研究获得新疆医科大学第一附属医院伦理委员会批准(批准号:K201706-06),所有研究对象均签署知情同意书。

1.2 细胞系及主要试剂 人卵巢颗粒细胞系 KGN 购自中国典型培养物保藏中心;DMEM/F12、青链霉素、含 EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶(美国 Hyclone 公司);胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(美国 Gibco 公司);人工重组 MIF、CCK-8 试剂、氯喹(chloroquine, CQ)(美国 Sigma 公司);人 MIF 的 ELISA 检测试剂盒、细胞裂解液 RIPA、蛋白酶抑制剂、BSA 蛋白定量试剂盒(武汉博士德生物公司);葡萄糖摄取-Glo™试剂盒(美国 Promega 公司);大鼠抗微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule-associated protein light chain, LC3)、自噬相关基因 7(autophagy related genes 7, Atg7)、泛素结合蛋白(ubiquitin binding protein, p62)单克隆抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司);兔抗胰岛素受体底物-1(insulin receptor substrate-1, IRS-1)、葡萄糖转运蛋白 4(glucose transporter 4, GLUT4)、磷酸化蛋白激酶 B(phosphorylated protein kinase B, p-Akt)、蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)、 β -actin(美国 Abcam 公司);兔抗大鼠和山羊抗兔 IgG(武汉三鹰生物科技公司)。

1.3 方法

1.3.1 实验室相关指标的检测 所有受试者的空腹血糖(fasting plasma glucose, FPG)、空腹胰岛素(fasting insulin, FINS)、HbA1c、基础性激素 6 项,包括促卵泡激素(follicle stimulating hormone, FSH)、促黄体生成素(luteinizing hormone, LH)、睾酮(testosterone, T)、雌二醇(17 β -estradiol, E2)、催乳素(prolactin, PRL)和抗苗勒管激素(anti-Mulerian hormone, AMH)均由本院检验科完成。

1.3.2 卵泡液的收集和原代颗粒细胞的分离 取卵时由技术人员采集受试者优势卵泡的卵泡液及冲洗液,1 800 r/min 离心 10 min,收集上层清液进行 MIF 测定,取底层细胞,并参考文献^[3]方法使用 Ficoll-Paque 密度梯度法分离纯化卵巢颗粒细胞。

1.3.3 ELISA 法检测卵泡液中 MIF 水平 取方法 1.3.2 项收集的卵泡液,参考 ELISA 试剂盒说明书方法检测三组受试者卵泡液中 MIF 表达水平。试

验单独重复 3 次。

1.3.4 透射电子显微镜(transmission electron microscopic, TEM)观察颗粒细胞中自噬水平 取方法 1.3.2 项分离纯化的原代卵巢颗粒细胞, PBS 洗涤后,依次使用 2% 戊二醛与 1% 四氧化锇于 4 °C 下分别固定 2 h,常规脱水,浸润,包埋,制成超薄切片(70 nm)后,柠檬酸铅染色,TEM 观察三组受试者颗粒细胞切片中的自噬空泡数量。

1.3.5 细胞的培养与分组 人卵巢颗粒细胞系 KGN 培养于含 10% FBS、1% 双抗的 DMEM/F12 培养基中,并置于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中进行培养。按实验目的将上述颗粒细胞分为 4 组:正常培养组(negative control, NC 组)、MIF 组(100 μ g/L MIF)、CQ 组(40 μ mol/L CQ)、MIF + CQ 组(100 μ g/L MIF 与 40 μ mol/L CQ 联合处理)。各组细胞置于上述条件的培养箱中培养 24 h 后进行后续相关实验。

1.3.6 CCK-8 法检测 MIF 对颗粒细胞活性的影响

取处于对数生长期的 KNG 细胞接种至 96 孔板中,待细胞生长融合至 80% 时,分别加入 0、10、50、100、500、1 000 μ g/L MIF,刺激细胞 24 h 后,再加入 10 μ l 的 CCK-8 试剂,继续孵育 4 h,酶标仪 450 nm 处检测每孔细胞的吸光度值,计算分析每组细胞增殖活性。每个浓度设置 5 个复孔,实验单独重复 3 次。

1.3.7 Western blot 检测颗粒细胞中自噬相关蛋白与胰岛素信号通路相关蛋白的表达 取待测细胞,使用 RIPA 裂解液及蛋白酶抑制剂提取细胞中的总蛋白,BSA 测定蛋白浓度后,取等量蛋白样品在 10% 的 SDS-PAGE 凝胶中进行电泳分离,湿转法将分离后的蛋白条带转移至 PVDF 膜上,5% 的脱脂奶粉于室温下进行抗体封闭 2 h,随后分别加入 LC3(1 : 800)、Atg7(1 : 800)、p62(1 : 800)、IRS-1(1 : 800)、Akt(1 : 1 000)、p-Akt(1 : 1 000)、GLUT4(1 : 800)和 β -actin(1 : 2 000),4 °C 孵育过夜,次日洗涤后,加入相应二抗(1 : 5 000),并于室温下孵育 2 h,最后滴加 ECL 发光液,以 β -actin 作为内参检测蛋白条带。Image J 软件分析条带灰度值。实验单独重复 3 次。

1.3.8 检测颗粒细胞对葡萄糖摄取情况 取处于对数生长期的 KNG 细胞,调整细胞密度至 5×10^4 /孔后,接种至 96 孔板中,培养 24 h 后按方法 1.3.5 项的处理方式将细胞分为 4 组,使用 100 nmol/L 的胰岛素刺激各组细胞 45 min 后,按照葡萄糖摄取-Glo™试剂盒说明书方法检测各组颗粒细胞的葡萄

糖摄入量。实验单独重复3次。

1.4 统计学处理 使用 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计分析及绘图。所有数据结果使用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)及两两比较的 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 受试者的一般临床资料 如表 1 所示,对照组、PCOS 伴 IR 组、PCOS 不伴 IR 组在年龄、FSH、E2 及催乳素水平方面的差异均无统计学意义($P > 0.05$);而后两组的基础 AMH、LH 及 T 水平和 LH/FSH 比值均高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),且 PCOS 伴 IR 组与 PCOS 不伴 IR 组间的差

异无统计学意义($P > 0.05$);而 PCOS 伴 IR 组在 BMI、FPG、FINS、HOMA-IR 和 HbA1C 水平均高于 PCOS 不伴 IR 组和对照组($P < 0.05, P < 0.01$),而后两组之间的差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 PCOS 伴 IR 组的卵泡液中 MIF 的表达与颗粒细胞的自噬水平升高 ELISA 法检测结果显示,PCOS 伴 IR 组的 MIF 浓度高于对照组与 PCOS 不伴 IR 组($P < 0.01$),后两组之间 MIF 表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。TEM 观察结果显示,PCOS 伴 IR 组的颗粒细胞中自噬空泡数量多于对照组和 PCOS 不伴 IR 组($P < 0.05$),后两组细胞中的自噬空泡数量差异无统计学意义($P > 0.05$)。Western blot 检测结果表明,PCOS 伴 IR 组细胞中 LC3 II/LC3 I 比值高于对照组与 PCOS 不伴 IR 组($P < 0.05$),后两组之间的差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 1。

表 1 三组受试者一般临床资料的比较($n=20, \bar{x} \pm s$)

指标	对照组	PCOS 不伴 IR 组	PCOS 伴 IR 组	F 值	P 值
年龄(岁)	28.11 ± 1.46	27.33 ± 1.29	27.22 ± 1.07	3.11	0.061
BMI(kg/m ²)	21.54 ± 0.21	22.15 ± 0.63	25.09 ± 0.45*##	49.22	<0.001
FSH(IU/L)	6.17 ± 1.15	6.22 ± 1.29	5.98 ± 1.20	1.64	0.057
LH(IU/L)	4.38 ± 1.57	8.51 ± 6.48*	9.12 ± 4.73*	42.52	<0.001
LF/FSH	0.74 ± 0.18	1.14 ± 0.09*	1.59 ± 0.17*	87.93	<0.001
E2(ng/L)	28.49 ± 4.18	31.26 ± 2.21	30.55 ± 1.96	4.03	0.076
T(μg/L)	39.22 ± 6.50	74.16 ± 11.08*	79.02 ± 9.53*	57.04	<0.001
PRL(μg/L)	16.55 ± 1.41	16.71 ± 2.09	16.19 ± 1.18	1.03	0.225
AMH(μg/L)	4.9 ± 0.77	9.7 ± 0.63*	10.0 ± 1.01*	36.47	<0.001
FPG(mol/L)	4.42 ± 0.61	4.87 ± 0.54	5.50 ± 0.73*##	48.62	<0.001
FINS	5.91 ± 0.42	5.97 ± 0.88	15.46 ± 1.72*##	119.07	<0.001
HOMA-IR	1.23 ± 0.07	1.48 ± 0.41	3.79 ± 0.81*##	23.20	0.002
HbA1C(%)	4.36 ± 0.67	4.72 ± 0.51	6.19 ± 0.20*##	67.68	<0.001

与对照组比较: * $P < 0.01$, ** $P < 0.01$;与 PCOS 不伴 IR 组比较: # $P < 0.05$

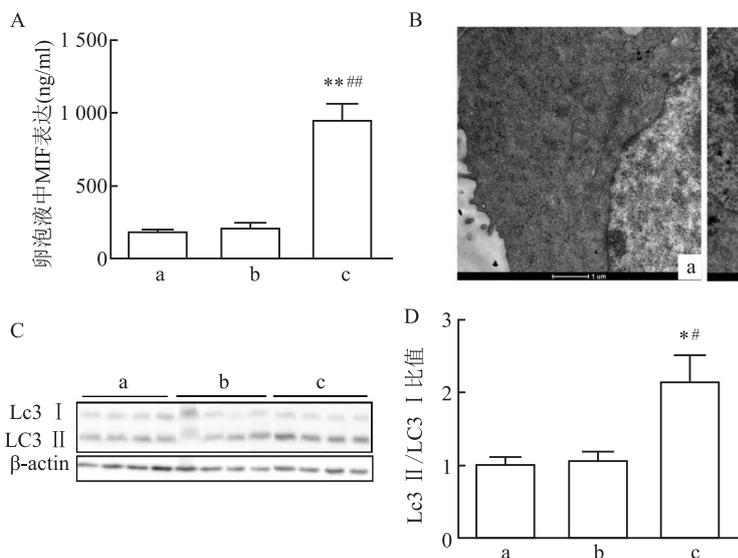


图 1 各组患者卵泡液中 MIF 的表达及颗粒细胞自噬水平的比较

A: ELISA 法检测各组患者卵泡液中 MIF 的含量; B: TEM 观察颗粒细胞中的自噬空泡 ×700 000; 黑色箭头指示自噬空泡; C: Western blot 检测颗粒细胞中 LC3 I 和 LC3 II 的蛋白表达; D: 颗粒细胞中 LC3 II/LC3 I 比值分析; a: 对照组; b: PCOS 不伴 IR 组; c: PCOS 伴 IR 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 PCOS 不伴 IR 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

2.3 MIF 抑制颗粒细胞的增殖活性 CCK-8 法检测结果显示, MIF 以浓度依赖方式降低细胞的存活率, 其中与 0 $\mu\text{g/L}$ MIF 相比, 50、100、500、1 000 $\mu\text{g/L}$ MIF 作用于细胞 24 h 后, 细胞的存活率降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 但考虑高浓度的 MIF (500、1 000 $\mu\text{g/L}$) 对颗粒细胞的存活率抑制作用均超过 50%, 故选择 100 $\mu\text{g/L}$ MIF 作为最适浓度应用于后续实验, 见图 2。

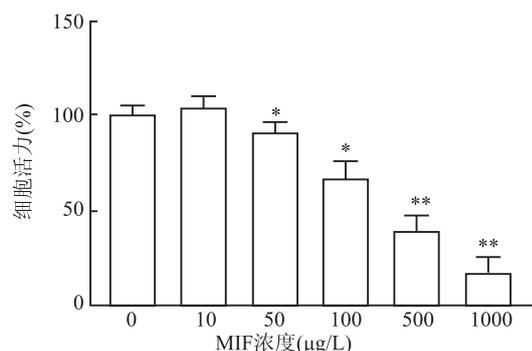


图2 CCK-8 法检测不同浓度 MIF 对颗粒细胞活性的影响
与 0 $\mu\text{g/L}$ MIF 比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.4 MIF 促进颗粒细胞中的自噬水平 Western blot 检测结果显示, 与 NC 组相比, MIF 组与 MIF + CQ 组颗粒细胞中 LC3 II/LC3 I 比值与 Atg7 蛋白表达增加 ($P < 0.05$), 而 p62 蛋白表达降低 ($P < 0.05$), CQ 组细胞的上述自噬标志物表达差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 而与 MIF 组相比, MIF + CQ 组颗粒细胞中 LC3 II/LC3 I 比值、Atg7 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$), p62 蛋白水平升高 ($P < 0.05$), 见图 3。

2.5 MIF 抑制颗粒细胞中胰岛素信号通路相关蛋白的表达 Western blot 检测结果显示, 与 NC 组相比, MIF 组与 MIF + CQ 组颗粒细胞中 IRS-1 蛋白、Akt 蛋白磷酸化水平和 GLUT4 蛋白表达均降低 (P

< 0.05), CQ 组细胞中上述蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 而与 MIF 组相比, MIF + CQ 组细胞中 IRS-1 蛋白、Akt 蛋白磷酸化水平及 GLUT4 蛋白表达均增加 ($P < 0.05$)。己糖激酶检测各组颗粒细胞上清液中葡萄糖含量的结果显示, 与 NC 组相比, MIF 组和 MIF + CQ 组细胞中葡萄糖摄取量降低 ($P < 0.01$), 而 CQ 组细胞对葡萄糖的摄取量差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 MIF 组相比, MIF + CQ 组细胞对葡萄糖摄取量增加 ($P < 0.05$), 见图 4。

3 讨论

PCOS 是临床最为常见的女性内分泌疾病之一, 影响 6% ~ 8% 的育龄期女性, 且占无排卵女性的 75% 左右^[1]。而卵巢颗粒细胞正常功能的维持对卵母细胞的发育、雌激素的产生和黄体的形成发挥着重要作用^[2]。研究^[2-3,9]表明, 颗粒细胞 IR 可导致卵泡发育障碍、排卵失败、雌激素水平的降低, 进而诱导雄激素水平的升高。此外, 由于 IR 的产生, 机体还会代偿性出现高胰岛素血症。而胰岛素作为一种有效的细胞生长促进激素和雄激素产生刺激剂, 其诱导产生的高水平睾酮则能进一步导致 PCOS 患者的卵泡闭锁和排卵障碍。因此, IR 介导的高胰岛素能以正反馈的形式加重 PCOS 症状, 故积极探索颗粒细胞 IR 发展的具体机制对改善 PCOS 的治疗及预后具有重要意义。

MIF 最早被认为是淋巴细胞的分泌产物, 但随着研究的深入, 发现包括巨噬细胞、内分泌细胞、成纤维细胞在内的多种细胞均能产生 MIF, 即其具有普遍表达性^[6]。研究^[6]表明, MIF 具有促炎、免疫调节、趋化及抗糖皮质激素等多种作用。同时, 在炎症反应参与的内分泌疾病中, 如 2 型糖尿病、肥胖、库欣综合征等, MIF 的表达均异常升高, 其作用机制一方面与 MIF 具有的促炎作用相关, 另一方面可能与

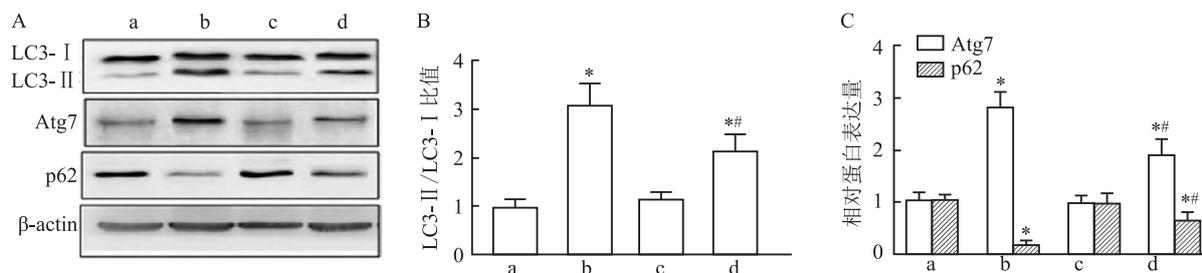


图3 Western blot 法检测 MIF 对颗粒细胞中的自噬水平的影响

A: Western blot 法检测各组颗粒细胞中 LC3、Atg7、p62 的蛋白表达; B: 各组颗粒细胞中 LC3 II/LC3 I 比值分析; C: 各组颗粒细胞中 Atg7、p62 蛋白表达的结果分析; a: NC 组; b: MIF 组; c: CQ 组; d: MIF + CQ 组; 与 NC 组比较: * $P < 0.05$; 与 MIF 组比较: # $P < 0.05$

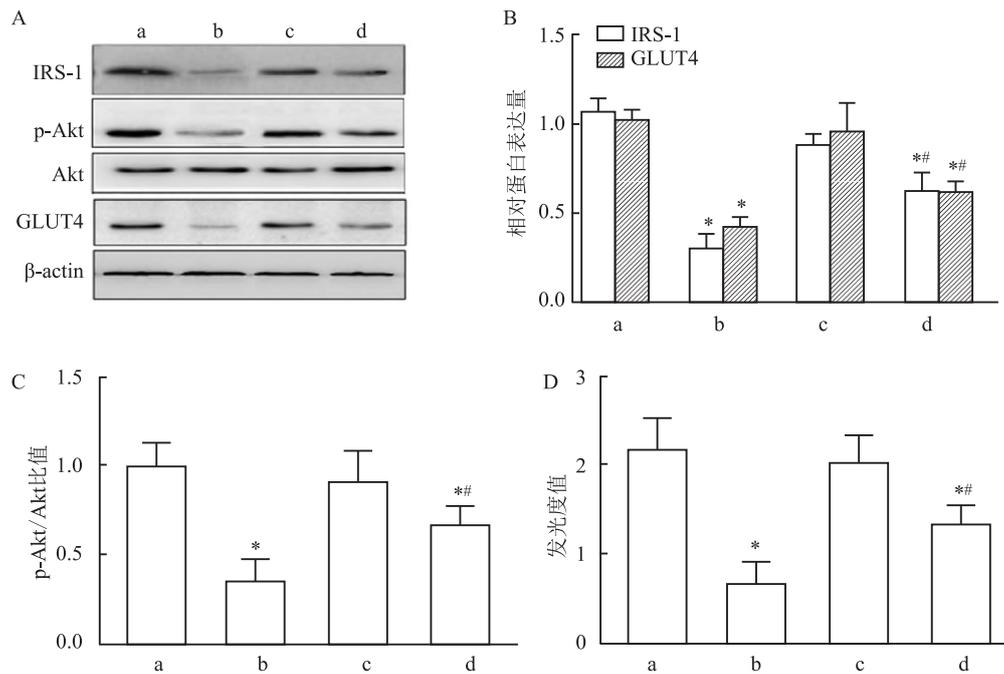


图4 MIF对颗粒细胞中胰岛素信号通路传导的影响

A: Western blot 检测各组颗粒细胞中胰岛素信号传导通路中相关蛋白 IRS-1、p-Akt、Akt 及 GLUT4 的表达;B: 各组颗粒细胞中 IRS-1 和 GLUT4 的蛋白表达分析;C: 各组颗粒细胞中 Akt 蛋白磷酸化水平的分析;D: 各组颗粒细胞对葡萄糖摄取量的结果分析;a: NC 组;b: MIF 组;c: CQ 组;d: MIF + CQ 组;与 NC 组比较: * $P < 0.05$; 与 MIF 组比较: # $P < 0.05$

MIF 能够抑制胰岛素受体后信号通路的表达有关^[7]。而对 PCOS 患者来说,近年来研究^[8-9]显示, MIF 的表达水平在 PCOS 患者外周血中较对照人群增加,并与患者的 BMI 及 IR 呈正相关。本研究结果同样表明,MIF 在 PCOS 伴 IR 患者的卵泡液中同样存在异常升高的现象,且异常增加 MIF 可能通过抑制 IRS1 蛋白表达与 Akt 的磷酸化水平促进卵巢颗粒细胞的 IR 发生,后两者是胰岛素信号通路的重要调控因子^[7]。同时,利用 CQ 与 MIF 进行联合干预后,MIF 诱导的颗粒细胞胰岛素敏感性受损和自噬水平升高现象均能够被 CQ 所改善。这提示 MIF 诱导的颗粒细胞自噬激活和胰岛素敏感性受损具有相关性。而自噬作为一种响应能量应激的主要降解途径,对于维持细胞内能量稳态与大分子的合成具有重要作用^[14]。研究^[11-12,15]表明,MIF 在多种疾病中能通过上调自噬的水平来促进疾病的发展。如幽门螺杆菌相关的胃癌中,MIF 能通过促进肠化生组织中自噬标志蛋白 LC3 与 Atg7 的表达,从而加速细胞的恶化^[15]。LC3 是自噬反应中的关键分子,其在细胞发生能量匮乏或不良刺激时被转录并激活,随后翻译出 LC3 前体,并在自噬体膜形成的过程中被 ATG4B 剪切形成 LC3 I,而经 Atg7 催化作用下 LC3 I 与自噬膜结合形成 LC3 II,故 LC3 II/LC3 I

比值常被用来作为细胞自噬的水平^[14]。而 p62 作为一种泛素结合蛋白,能够与定位于自噬小体内膜中的 LC3 II 蛋白形成复合物,在自噬溶酶体内降解,故其表达与自噬水平呈负相关^[16]。

综上,本研究表明 MIF 的异常高表达能够促进 PCOS 患者卵巢颗粒细胞 IR 的发展,且可能与 MIF 诱导的细胞自噬水平增加具有相关性。这进一步证实 MIF 在 PCOS 的发生和发展中具有促进作用,并提出其可能与颗粒细胞的自噬相关的论点。上述结果提示,MIF 有望成为 PCOS 治疗的潜在作用靶点。

参考文献

- [1] 姜小花,徐玉萍,魏兆莲,等. 子宫厚度对 PCOS 冻胚移植周期妊娠结局的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(10): 1633-6.
- [2] Wang J, Wu D, Guo H, et al. Hyperandrogenemia and insulin resistance: The chief culprit of polycystic ovary syndrome[J]. Life Sci, 2019, 236:116940.
- [3] Tao T, Xu H. Autophagy and obesity-related reproductive dysfunction[J]. Adv Exp Med Biol, 2020, 1207:463-6.
- [4] Li D, You Y, Bi F F, et al. Autophagy is activated in the ovarian tissue of polycystic ovary syndrome[J]. Reproduction, 2018, 155(1):85-92.
- [5] Velez L M, Seldin M, Motta A B. Inflammation and reproductive function in women with polycystic ovary syndrome[J]. Biol Re-

- prod, 2021,104(6):1205-17.
- [6] Hertelendy J, Reumuth G, Simons D, et al. Macrophage migration inhibitory factor - A favorable marker in inflammatory diseases? [J]. Curr Med Chem, 2018,25(5):601-5.
- [7] Stošić-Grujičić S, Saksida T, Miljković Đ, et al. MIF and insulin: Lifetime companions from common genesis to common pathogenesis[J]. Cytokine, 2020,125:154792.
- [8] González F, Rote N S, Minium J, et al. Elevated circulating levels of macrophage migration inhibitory factor in polycystic ovary syndrome[J]. Cytokine, 2010,51(3):240-4.
- [9] Calan M, Kume T, Yilmaz O, et al. A possible link between luteinizing hormone and macrophage migration inhibitory factor levels in polycystic ovary syndrome[J]. Endocr Res, 2016,41(3):261-9.
- [10] Li C, Qiao B, Zhan Y, et al. First evidence of genetic association between the MIF-173G/C single-nucleotide polymorphisms and polycystic ovary syndrome[J]. Am J Reprod Immunol, 2011,66(5):416-22.
- [11] Chao C H, Chen H R, Chuang Y C, et al. Macrophage migration inhibitory factor-induced autophagy contributes to thrombin-triggered endothelial hyperpermeability in sepsis[J]. Shock, 2018,50(1):103-11.
- [12] Li S, Nie K, Zhang Q, et al. Macrophage migration inhibitory factor mediates neuroprotective effects by regulating inflammation, apoptosis and autophagy in Parkinson's disease[J]. Neuroscience, 2019,416:50-62.
- [13] Alebić M Š, Bulum T, Stojanović N, et al. Definition of insulin resistance using the homeostasis model assessment (HOMA-IR) in IVF patients diagnosed with polycystic ovary syndrome (PCOS) according to the Rotterdam criteria[J]. Endocrine, 2014,47(2):625-30.
- [14] Pantoom S, Pomorski A, Huth K, et al. Direct interaction of ATP7B and LC3B proteins suggests a cooperative role of copper transportation and autophagy[J]. Cells, 2021,10(11):3118.
- [15] Yoon K, Kim N, Park Y, et al. Correlation between macrophage migration inhibitory factor and autophagy in helicobacter pylori-associated gastric carcinogenesis[J]. PLoS One, 2019,14(2):e0211736.
- [16] Manley S, Williams J A, Ding W X. Role of p62/SQSTM1 in liver physiology and pathogenesis[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2013,238(5):525-38.

MIF promotes insulin resistance in ovarian granulosa cells by inducing autophagy

Gong Xiaoyun^{1,2}, Han Rui^{1,2}, Zhang Yunian^{1,2}, La Xiaolin^{1,2}

(¹Reproductive Medicine Center, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054;

²State Key Laboratory of Pathogenesis, Prevention and Treatment of High Incidence Diseases in Central Asia, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054)

Abstract Objective To investigate the expression of macrophage migration inhibitory factor (MIF) and its effect on autophagy and insulin resistance of ovarian granulosa cells in polycystic ovary syndrome (PCOS). **Methods** Follicular fluid and ovarian granulosa cells were collected from 40 PCOS patients ($n=40$) and non PCOS patients (control group, $n=20$). PCOS included patients with IR (PCOS with IR, $n=20$) and patients without IR (PCOS without IR, $n=20$). The expression of MIF in follicular fluid was detected by ELISA. The ratio of autophagy vacuoles to microtubule-associated protein light chain II (LC3 II)/microtubule-associated protein light chain I (LC3 I) in granulosa cells was observed by transmission electron microscopy and Western blot. Human ovarian granule cell line KNG was cultured *in vitro* and CCK-8 was used to detect the effects of different concentrations of MIF on granule cell activity. KNG cells were divided into four groups: normal culture group (NC group), MIF group, chloroquine group (CQ group) and MIF + CQ group. The effects of MIF on the expression of autophagy related proteins LC3, autophagy related genes 7 (Atg7), ubiquitin binding protein (p62), and insulin signaling pathway related proteins insulin receptor substrate-1 (ISR-1), glucose transporter 4 (GLUT4), protein kinase B (Akt) phosphorylation were observed by Western blot, and the effect of MIF on glucose uptake ability of granulosa cells was detected by glucose uptake test. **Results** Compared with the control group or PCOS without IR group, MIF expression in follicular fluid and autophagy level of granulosa cells in PCOS with IR group increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); *In vitro* experiments showed that MIF could significantly inhibit the cellular activity of KNG in granulocytes in a concentration-dependent manner, in which 100 ng/ml MIF was selected for subsequent relevant experiments; Compared with NC group, LC3 II/LC3I ratio and Atg7 protein in MIF group and MIF + CQ group increased ($P <$

奥贝胆酸对 DEHP 亚急性暴露导致小鼠胆汁淤积的保护作用

屈明超¹, 赵凡¹, 张程², 张佳怡¹, 叶露¹, 张伦¹, 余芸¹, 王建青¹

摘要 目的 探讨奥贝胆酸(OCA)对邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP)暴露致小鼠胆汁淤积的保护作用。方法 动物实验一:将雌性 ICR 小鼠随机分为 3 组:对照组、DEHP 低剂量组[50 mg/(kg·d)]、DEHP 高剂量组[200 mg/(kg·d)],共灌胃 18 d,建立胆汁淤积模型。动物实验二:将雌性 ICR 小鼠随机分为 4 组:对照组、OCA 组、DEHP 模型组[200 mg/(kg·d)]、DEHP + OCA 组,共灌胃 18 d,其中 OCA 灌胃时间为第 12~18 天。收集所有小鼠血液与肝脏组织,检测血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆汁酸(TBA)水平和肝脏中的 TBA 水平;检测肝脏中法尼醇 X 受体(FXR)的蛋白表达水平以及 FXR 和其靶基因 SHP 的 mRNA 水平,HE 染色观察肝脏组织病理变化。结果 实验一:与对照组相比,仅 DEHP 高剂量组暴露后小鼠肝脏质量、肝重指数、血清和肝脏中 TBA 水平升高($P < 0.01$),表明高剂量 DEHP 暴露可导致小鼠胆汁淤积。实验二:与 DEHP 模型组相比,OCA 处理后其肝脏质量、肝重指数、血清和肝脏中的 TBA 水平均降低($P < 0.01$)。与对照组相比,DEHP[200 mg/(kg·d)]处理后 FXR 的蛋白表达水平及其 mRNA 水平均降低;与 DEHP 模型组相比,OCA 处理后 FXR 的蛋白表达水平以及 FXR、SHP 的 mRNA 水平均增加($P < 0.05$)。结论 DEHP 暴露可诱导小鼠胆汁淤积性肝损伤的发生,且 OCA 后处理对 DEHP 诱导的小鼠胆汁淤积有保护作用。

关键词 邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯;奥贝胆酸;胆汁淤积

中图分类号 R 966

2022-05-30 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82073566)

作者单位:¹ 安徽医科大学第四附属医院药学部,合肥 230012

² 安徽医科大学公共卫生学院卫生毒理学系,环境毒理学安徽普通高校重点实验室,合肥 230032

作者简介:屈明超,男,硕士研究生;

王建青,女,教授,主任药师,博士生导师,责任作者, E-mail: jianqingwang81@126.com

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)10-1608-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.10.018

胆汁淤积是由各种原因引起的胆汁合成、分泌及排泄障碍而导致胆汁过度堆积的过程^[1]。已知胆汁淤积的发生涉及雌激素、遗传及环境等多种因素。邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯[di(2-ethylhexyl) phthalate, DEHP]是邻苯二甲酸酯(phthalates, PAEs)中应用最广泛的增塑剂,生活中被广泛应用于各种塑料制品中^[2-3]。已知 DEHP 可通过氧化应激和炎症反应等对肝脏产生毒性作用^[4],另有临床研究^[5]表明使用含有 DEHP 的输液管可显著增加胆汁淤积发生率。针对胆汁淤积性肝损伤,目前临床治疗上仍无特效药物,主要使用的有熊去氧胆酸(ursodeoxycholic acid, UDCA)和腺苷蛋氨酸等^[6],然而对于部分胆汁淤积患者并没有很好的治疗效果。奥贝胆酸(obeticholic acid, OCA)是一种选择性法尼醇 X 受体(farnesoid X receptor, FXR)激动剂,在调节胆汁酸代谢中发挥着重要的作用^[7]。该研究旨在探究 DEHP 暴露与胆汁淤积的关系,以及 OCA 后处理的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雌性 ICR 小鼠,8 周龄,26~30 g,SPF 级,购于北京维通利华实验动物技术有限公司。小鼠饲养在适宜的环境中:温度保持在(25±1)℃,湿度保持在(55±5)%,实验开始前将小鼠适应性饲养 7 d。本研究所使用的动物实验均已通过安徽医科大学动物伦理委员会审查并批准(编号:20200523)。

1.1.2 主要试剂 天门冬氨酸氨基转移酶(aspar-

0.05), while p62 protein, IRS-1 protein, Akt phosphorylation level, GLUT4 protein expression level and glucose uptake ability decreased ($P < 0.05$), while the above autophagy markers in MIF + CQ group were significantly higher than those in MIF group ($P < 0.05$), and the protein related to insulin signal transduction and glucose uptake increased ($P < 0.05$). **Conclusion** MIF may promote IR development in PCOS patients by up-regulating the autophagy level of granulosa cells, while inhibiting the autophagy of granulosa cells can improve MIF-induced IR.

Key words polycystic ovary syndrome; macrophage migration inhibitor; insulin resistance; granulosa cells