

本文引用:王隆卉,管宇,倪晓容.HMGB1介导NF- κ B通路促进多囊卵巢综合征胰岛素抵抗细胞模型的凋亡[J].湖南中医药大学学报,2018,38(4):379-383.

HMGB1介导NF- κ B通路促进多囊卵巢综合征 胰岛素抵抗细胞模型的凋亡

王隆卉,管宇,倪晓容*

(上海中医药大学附属市中医医院妇科,上海 200071)

[摘要] **目的** 探讨高迁移率族蛋白1(HMGB1)对胰岛素抵抗的大鼠卵巢颗粒细胞I κ B/NF- κ B信号通路的影响。**方法** 体外培养正常大鼠卵巢颗粒细胞,设对照组、不同浓度胰岛素干预组,不同浓度HMGB1干预组,胰岛素抵抗+si-HMGB1干预组等,用酶联免疫吸附法(ELISA)测定葡萄糖、HMGB1、雄激素、TNF- α 、磷酸化NF- κ B p65的含量;免疫印迹检测I κ Ba、pI κ Ba、Caspase3和Cleaved Caspase3的蛋白表达。**结果** 与对照组比较,胰岛素过高导致大鼠卵巢细胞的葡萄糖含量明显降低($P<0.05$);雄激素及相关炎症因子HMGB1、TNF- α 明显升高($P<0.01$),并激活转录因子NF- κ B p65并使其磷酸化程度明显升高($P<0.05$)。随着HMGB1浓度升高,雄激素、磷酸化I κ Ba、磷酸化NF- κ B p65和TNF- α 的表达量较对照组均明显升高($P<0.05$ or $P<0.01$);而当胰岛素抵抗的卵巢颗粒细胞中加入HMGB1的干扰小分子,则发现胰岛素抵抗带来的副作用得到缓解,较胰岛素抵抗对照组雄激素、Cleaved Caspase3、TNF- α 、磷酸化I κ Ba和磷酸化NF- κ B p65的表达量均显著性下降($P<0.05$ or $P<0.01$)。**结论** HMGB1在多囊卵巢综合征(PCOS)胰岛素抵抗卵巢颗粒细胞模型中促使炎症因子升高,可能介导了NF- κ B信号通路的激活,促进胰岛素抵抗卵巢颗粒细胞凋亡,参与了PCOS的发病。

[关键词] 高迁移率族蛋白1;多囊卵巢综合征;胰岛素抵抗;卵巢颗粒细胞

[中图分类号]R711.35 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.04.004

HMGB1 Mediates NF- κ B Pathway in Promoting the Apoptosis of Insulin Resistant Cell Model of Polycystic Ovary Syndrome

WANG Longhui, GUAN Yu, NI Xiaorong*

(Department of Gynecology, Shanghai Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Chinese Medicine, Shanghai 200071, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of HMGB1 on I κ B/NF- κ B signaling pathway in ovarian granulosa cells of rats with insulin resistant. **Methods** The ovarian granulosa cells in vitro were cultured, and the control group, different concentrations of insulin intervention groups, different concentrations of HMGB1 intervention groups and insulin resistance+si-HMGB1 group and others were designed. The levels of glucose, HMGB1, androgen, TNF- α and phosphorylated NF- κ B p65 were determined by enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA). The concentrations of I κ Ba, pI κ Ba, Caspase3 and Cleaved Caspase3 were detected by Western blotting. **Results** Compared with the control group, high insulin significantly decreased the glucose of rats ($P<0.05$), increased the androgen, HMGB1 and TNF- α ($P<0.01$) in ovarian granulosa cells, and then activated transcription factor NF- κ B p65, significantly increased phosphorylated NF- κ B p65($P<0.05$). Androgen, phosphorylated I κ Ba, phosphorylated NF- κ B p65 and TNF- α increased significantly with the increase of HMGB1 ($P<0.05$ or $P<0.01$). When

[收稿日期]2017-07-12

[基金项目]上海市自然科学基金项目(17ZR1427900);上海市卫生局和计划生育委员会科研课题(201540087)。

[作者简介]王隆卉,女,主任医师,研究方向:中医妇科以及生殖内分泌。

[通讯作者]*倪晓容,女,博士,副主任医师,E-mail:1120@szy.sh.cn。

adding HMGB1 interference small molecules into the ovarian granulosa cells, side effects induced by insulin resistance relieved, and the expression of androgen, Cleaved caspase 3, TNF- α , phosphorylated I κ B α and phosphorylated NF- κ B p65 ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) were significantly lower than the control group. **Conclusion** HMGB1 could promote the increase of inflammatory factors in the PCOS insulin resistance ovarian granulosa cell model. HMGB1 may mediate the NF- κ B signaling pathway, promote the cell apoptosis in insulin resistance ovarian granulosa cells, also involve in the pathogenesis of PCOS.

[**Keywords**] polycystic ovary syndrome; high mobility group protein 1; insulin resistance; ovarian granulosa cells

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 是病因尚不明确的异质性、进行性、难治性的妇科内分泌疾病。其临床表现以高雄激素血症为普遍特征, 涉及月经失调、不孕、肥胖、多毛、痤疮等诸多方面^[1]。此外, PCOS 还通常伴有或引发多种并发症, 如, 胰岛素抵抗, 子宫内膜癌、高血压、代谢性综合症以及心血管系统疾病^[2-3]。西医认为卵巢颗粒细胞凋亡与 PCOS 排卵障碍具有密切关系^[4-5]。最近研究发现, 高迁移率族蛋白 1 (high mobility group box-1 protein, HMGB1) 介导了胰岛素抵抗 (insulin resistant, IR) 诱导的卵巢颗粒细胞凋亡^[6]。本文旨在研究体外 PCOS 模型中 HMGB1 促进胰岛素抵抗诱导的卵巢颗粒细胞凋亡的相关通路及其具体作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康雌性 SD 大鼠 (上海斯莱克实验动物有限责任公司, 合格证号: SCXK (沪) 2013-0003), SPF 级, 鼠龄 3-4 周, 体质量 50-100 g。室温 18-20 $^{\circ}$ C, 湿度为 65%-70%, 自由进食饮水。

1.1.2 主要试剂 DMEM/F12 培养基 (GIBCO 公司), 孕马血清促性腺激素 (宁波第二激素厂产品), 胎牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司)。合成的 si-HMGB1 (货号: 1027280) 购自德国 QIAGEN 公司。青霉素、链霉素, HMGB1 试剂 (H4652-1MG), 葡萄糖含量检测试剂盒 (Lot#SLBH0679V), 雄激素 (12850) 购自美国 Sigma 公司。pNF- κ Bp65 检测试剂盒 (ab176647), TNF- α 检测试剂盒 (ab46070), HMGB1 抗体 (ab79823), I κ B α 抗体 (ab32518) 购自英国 ABCAM 公司。pI κ B α 抗体 (#5209), Caspase3 抗体 (#9662P), Cleaved Caspase3 抗体 (#9661S) 购自美国 CST 公司。辣根过氧化物酶标记的二抗 (A0208, A0216) 购自碧云天公司。

1.1.3 主要仪器 MK3 型酶标仪 (美国 Thermo 公司), Autoblotsystem 20 型全自动蛋白印迹仪 (新加

坡 Genelabs 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 大鼠卵巢颗粒细胞的原代分离 SD 大鼠 (10 只) 腹腔注射 PMSG (8-10 U) 48 h 后腹腔麻醉, 无菌条件下迅速取出双侧卵巢, 用 PBS 缓冲液清洗 3 次, 在体视显微镜下去除其周围脂肪和被膜, 用 1 mL 注射器针头刺破卵泡使颗粒细胞和卵母细胞释放出来, 加入 1 g/L 透明质酸酶消化使颗粒细胞与卵母细胞分离, 用孔径为 200 目筛网过滤, 1 000 r/min 离心 5 min。弃上清, 用 PBS 缓冲液清洗 3 次, 加入基础培养液 (DMEM/F12 培养基+100 U/mL 青霉素+100 μ g/mL 链霉素+0.5 μ g/mL 两性霉素 2B+体积分数 10% FBS) 重悬, 而后计数, 鉴定, 活力测定。

1.2.2 多囊卵巢综合征细胞模型的建立^[6]及分组 分离获得的大鼠卵巢颗粒细胞原代培养 5 d 后, 传代培养至 60% 时, 加葡萄糖 (glucose) 和胰岛素 (insulin) 处理 48 h, 收集细胞用于下一步实验。体外培养大鼠卵巢颗粒细胞的 IR 模型, 分组设置分别为对照组 (+glucose 4.5 g/L, -insulin), IR 0.1 μ mol/L 组 (+glucose 4.5 g/L, +insulin 0.1 μ mol/L), IR 0.5 μ mol/L 组 (+glucose 4.5 g/L, +insulin 0.5 μ mol/L), IR 1.0 μ mol/L 组 (+glucose 4.5 g/L, +insulin 1.0 μ mol/L)。

体外检测不同浓度 HMGB1 刺激对卵巢颗粒细胞的影响, 设置分组为对照组, HMGB1 低浓度组 (10 ng/mL), HMGB1 中浓度组 (60 ng/mL), HMGB1 高浓度组 (150 ng/mL)。

检测 IR 的卵巢颗粒细胞通过 HMGB1 介导炎症及凋亡效应, 设置分组为: IR(-)+Si-HMGB1(-) 组, IR(-)+Si-HMGB1 (50 nmol/L) 组, IR (1.0 μ mol/L)+Si-HMGB1 (-) 组, IR (1.0 μ mol/L)+Si-HMGB1 (50 nmol/L) 组。

1.2.3 ELISA 法测定葡萄糖、HMGB1、雄激素 (androgen)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、核因子 κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B) p65 的含量 将样品上样至 96 孔板, 室温孵育 1-2 h, PBS

洗板,加一抗,室温孵育2 h,PBS洗板,加二抗,室温孵育1 h,加显色液,450 nm波长读值并计算。不同试剂盒按说明节操作。

1.2.4 Western blot 检测 I κ B α 、pI κ B α 、Caspase3 和 Cleaved Caspase3 的蛋白表达 不同细胞分组后处理48 h,收集细胞,RIPA裂解液裂解,提取总蛋白,测定总蛋白浓度。并取等量蛋白上样,电转膜后,脱脂奶粉室温封闭1 h,加对应一抗(详见试剂,1:1 000-1:5 000稀释),室温孵育3 h,TBST清洗,加相应二抗(详见试剂,1:1 000-1:2 000稀释)室温孵育45 min到1 h,ECL发光试剂盒显色,扫描并统计分析灰度值。

1.3 统计学分析

用SPSS 17.0统计软件分析数据,数据分析为差异统计学,以标准差“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,各组间比较用单因素方差分析,两两比较采用 t 检验。 $P<0.05$ 代表差异具有统计学意义, $P<0.01$ 代表差异具有显著统计学意义。

2 结果

2.1 卵巢颗粒细胞的原代分离及培养

大鼠原代卵巢细胞分离后,刚开始接种时颗粒细胞呈球形,10 h后贴壁生长,培养24 h后,形态不规则,呈多角形或梭形(图1:5 d)。培养10 d时可铺满皿底,形成单层的颗粒细胞(图1:10 d)。部分颗粒细胞还

出现聚集生长的特征,形成胚胎干细胞样集落。图1显示大鼠卵巢颗粒细胞的原代分离比较成功。

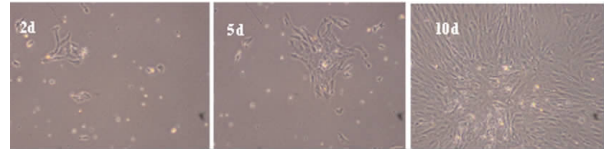


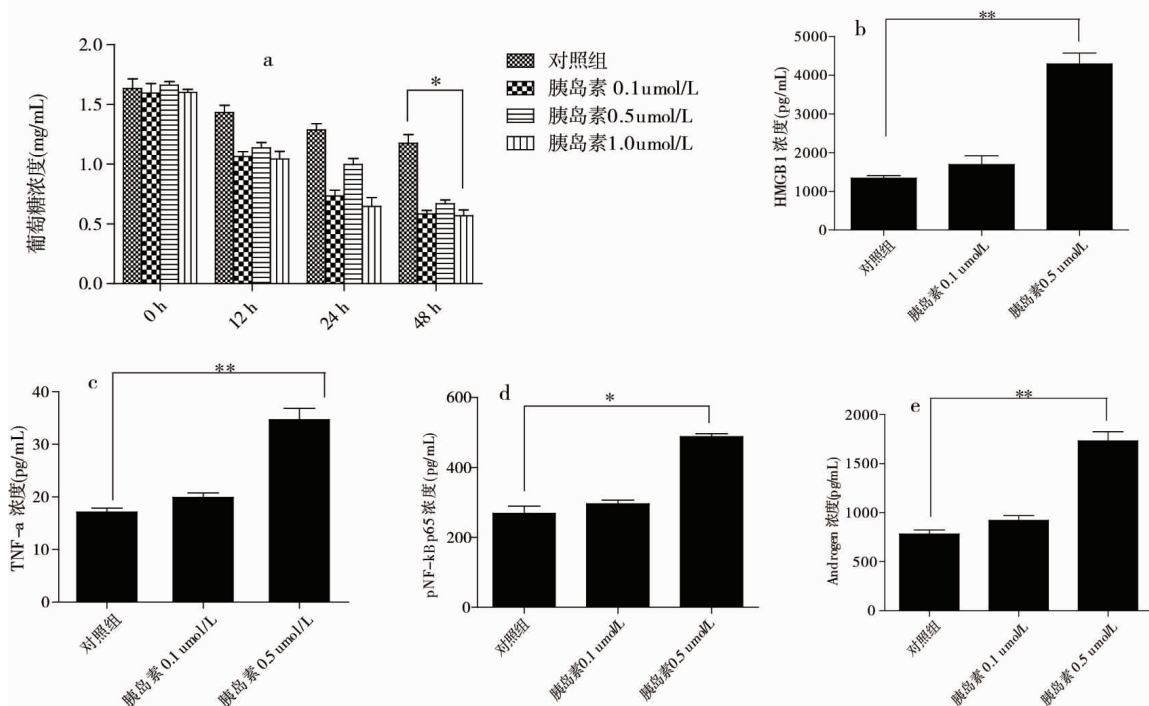
图1 倒置显微镜下大鼠原代卵巢颗粒细胞分离2 d, 5 d和10 d后培养效果图($\times 200$)

2.2 PCOS 卵巢颗粒细胞模型的构建

胰岛素对卵巢颗粒细胞的影响,加入不同浓度的胰岛素培养48 h后,收集并裂解细胞,检测其细胞因子发现高浓度胰岛素处理细胞后,会导致PCOS特征性因素葡萄糖相比未加胰岛素对照组明显降低($P<0.05$),雄激素较对照组明显升高($P<0.01$);同时相关炎症因子HMGB1、TNF- α 较对照组明显升高($P<0.01$),并激活转录因子NF- κ B p65使其磷酸化程度较对照组明显升高($P<0.05$)。由此可见,HMGB1、TNF- α 和NF- κ B均被胰岛素正向调控,呈现表达量明显上升。显示本实验建立的PCOS细胞模型相对有代表性^[6],且胰岛素过高造成的IR可能与炎症反应及NF- κ B通路直接相关。见图2。

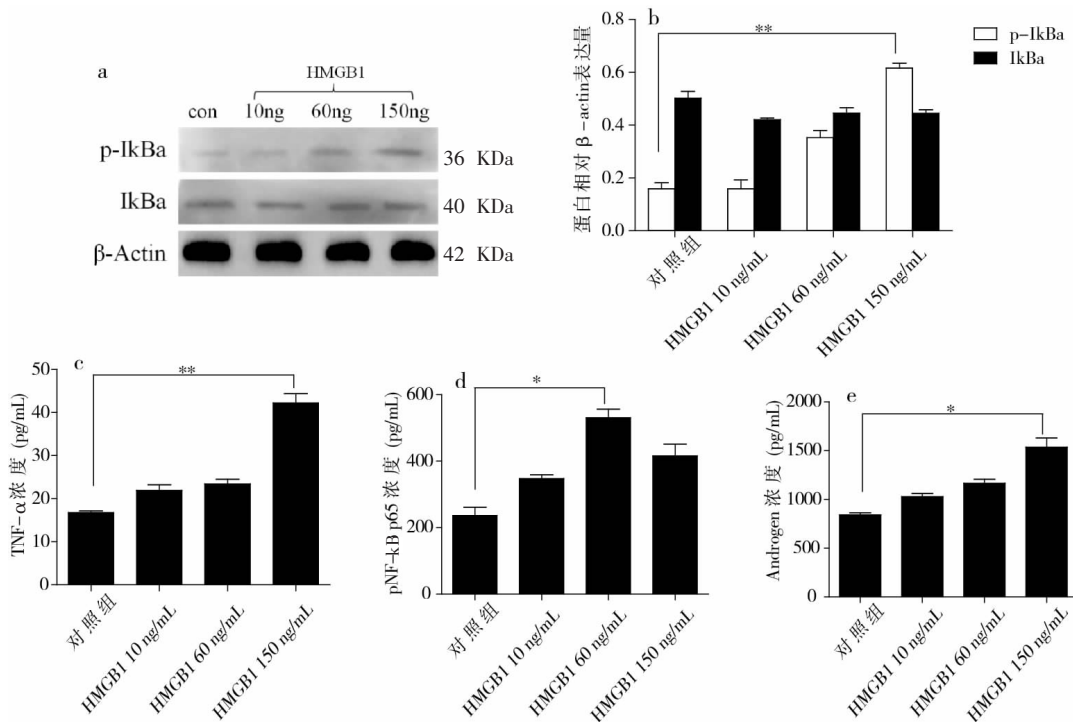
2.3 HMGB1介导p-I κ B α 和TNF- α 表达升高

随着HMGB1浓度升高,雄激素、磷酸化I κ B α 、磷酸化NF- κ B p65和TNF- α 的表达量都较对照组明显升高($P<0.05$ or $P<0.01$)。见图3。



注:(a)不同胰岛素影响的葡萄糖含量变化;(b)不同胰岛素影响的HMGB1含量变化;(c)不同胰岛素影响的TNF- α 含量变化;(d)不同胰岛素影响的pNF- κ B p65含量变化;(e)不同胰岛素影响的雄激素含量变化。** $P<0.01$,* $P<0.05$

图2 胰岛素处理对大鼠卵巢颗粒细胞的影响



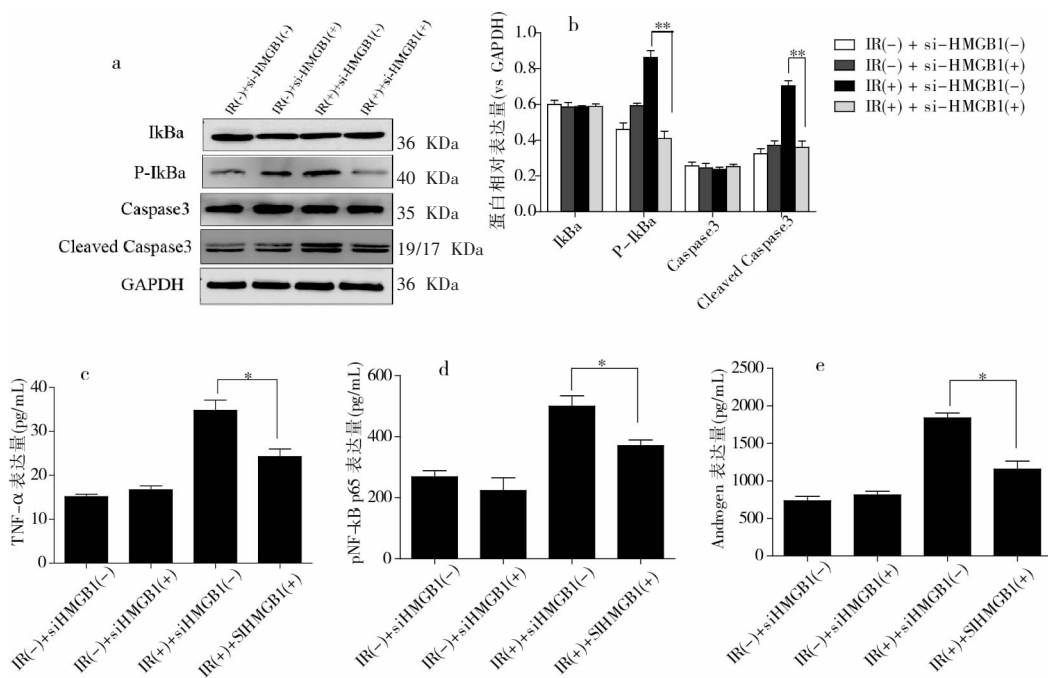
注: (a)IkBa 和 pIkBa 的免疫印迹结果; (b)IkBa 和 pIkBa 蛋白的相对表达量; (c)TNF-α 的含量变化; (d)pNF-kB p65 的含量变化; (e)雄激素的含量变化。 ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

图 3 HMGB1 体外作用对大鼠卵巢颗粒细胞影响

2.4 在 PCOS 卵巢颗粒细胞模型中 HMGB1 通过 TNF-α/NF-kB 通路促进细胞凋亡

当 IR 的卵巢颗粒细胞中加入 HMGB1 的干扰小分子,则发现 IR 带来的炎症现象得到有效缓解。

与 IR 对照组相比,雄激素、Cleaved Caspase-3、TNF-α、磷酸化 IkBa 和磷酸化 NF-kB p65 的表达量都发生了显著性下降 ($P < 0.05$ or $P < 0.01$),更加确定了 HMGB1 在此过程中起重要作用。见图 4。



注: (a)免疫印迹结果; (b)免疫印迹结果灰度值分析结果; (c)不同分组的 TNF-α 表达量; (d)不同分组的 pNF-kB p65 含量; (e)不同分组的雄激素含量。 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 4 HMGB1 对胰岛素抵抗的卵巢颗粒细胞的影响

3 讨论

50%~90%的PCOS患者存在IR、高胰岛素血症,使得其发生代谢综合征、II型糖尿病、心血管疾病的风险较普通人群增加5~10倍^[1]。深入探索PCOS患者高雄激素水平与糖脂代谢失衡之间的关系,对该疾病的风险预测及早期干预治疗具有重要意义。

有研究表明PCOS患者中炎症因子水平升高,在其发生发展的过程中存在低度慢性炎症^[6]。目前发现和PCOS密切相关的有c反应蛋白(c-reactive protein,CRP)、白细胞介素6(interleukin-6,IL-6)、TNF- α 、NF- κ B等慢性炎症因子的异常^[7-8]。其中TNF- α 是一种非糖化蛋白^[8-10],由多种炎症细胞合成和分泌,可通过多种机制调节组织释放TNF- α ,而TNF- α 可以通过多种作用机制影响胰岛素的敏感性,是重要的IR介质:它可以减少胰岛素受体底物1(insulin receptor substrate-1,IRS-1)的酪氨酸磷酸化,抑制胰岛素信号向IRS-1的传导^[11-12];下调多种脂肪细胞中多种细胞分子和蛋白表达,导致IR。研究发现,PCOS患者TNF- α 水平显著高于正常人群^[4],且肥胖者升高更明显^[13]。

TNF- α 能够诱导NF- κ B结合雄激素受体启动子,使其活性增加,降低颗粒细胞芳香酶活性,使得雄性激素转化成雌激素减少,引起高雄激素血症^[14]。NF- κ B的激活使得炎症因子表达增多,IR水平加重,雄激素水平升高,诱导PCOS的产生。而NF- κ B通路中最关键的上游因子即为HMGB1。

HMGB1是较新发现的一种炎性细胞因子,普遍存在于大多数的哺乳动物细胞的细胞核中,参与细胞核内多种生物学功能^[15]。胞外的HMGB1能够通过不同的受体途径影响NF- κ B的活性,发挥不同的生物学效应。除此以外,大量的研究证实,HMGB1与其受体相互作用,通过激活NF- κ B等信号通路,介导了如IR等许多病理过程的发生^[14-15]。

在本研究中发现IR的卵巢颗粒模型细胞中HMGB1水平较正常对照组表达明显增加。而当IR的卵巢颗粒细胞中加入HMGB1的干扰小分子,则发现IR带来的副作用得到缓解。较IR对照组而言,雄激素明显下降以及凋亡明显降低(Cleaved Caspase3),建议可作为PCOS治疗的靶点。TNF- α 、磷酸化I κ B α 和磷酸化NF- κ B p65的表达量较对照组

显著性下降,提示PCOS与炎症反应相关,并经HMGB1参与NF- κ B通道,该机制可能参与了PCOS的发病。

参考文献:

- [1] 刘颖华,侯丽辉,郝松莉.肥胖型多囊卵巢综合征的非药物治疗研究进展[J].中国中西医结合杂志,2013,32(12):1713-1716.
- [2] EVANTHIA DK, ANDREA D. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome revisited: an update on mechanisms and implications[J]. Endocrine Reviews, 2012, 33(6): 981-1030.
- [3] 邢玉,刘艳霞,佟庆.中医药辨证治疗多囊卵巢综合征临床研究进展[J].环球中医药,2016,9(7):887-891.
- [4] 赵娜,杨正望,全春梅.多囊卵巢综合征临床分型与中医证型的相关性分析[J].湖南中医药大学学报,2017,37(9):966-968.
- [5] LI L, MO H, ZHANG J, et al. The role of heat shock protein 90B1 in patients with polycystic ovary syndrome. picard D, ed [J]. PLoS ONE, 2016,11(4):e0152837.
- [6] NI X R, SUN Z J, HU G H, et al. High concentration of insulin promotes apoptosis of primary cultured rat ovarian granulosa cells via its increase in extracellular HMGB1[J]. Reprod Sci, 2015, 22(3):271-277.
- [7] 戴金颖,张军,袁洁,等.脂肪组织与2型糖尿病胰岛素抵抗的研究进展[J].湖南中医杂志,2017,219(5):186-188.
- [8] KOC O, OZDEMIRICI S, ACET M, et al. Nuclear factor- κ B expression in the endometrium of normal and overweight women with polycystic ovary syndrome [J]. J Obstet Gynaecol, 2017, 37(7):924-930.
- [9] SZCZUKO M, ZAPALOWSKA-CHWYĆ M, MACIEJEWSKA D, et al. High glycemic index diet in PCOS patients. The analysis of IGF I and TNF- α pathways in metabolic disorders [J]. Med Hypotheses, 2016, 96(11):42-47.
- [10] 陈英,梁辉,王娜.补肾调肝方对多囊卵巢模型大鼠血清TGF- β 1、IGF-1、TNF- α 及激素水平的影响[J].陕西中医,2017,38(8):1148-1150.
- [11] 杨玉红,刘晓宇,殷文娟.新诊断2型糖尿病血清Apelin及TNF- α 水平与胰岛素抵抗的相关性研究[J].黑龙江医药科学,2013,36(1):33-34.
- [12] 张淑芳,于易,田晓蕾,等.妊娠糖尿病患者血清脂联素水平变化及其与炎症因子胰岛素抵抗的关系[J].河北医学,2015(2):272-275.
- [13] 王丽萍,方春霞,蔡文伟,等.PCOS患者AMH水平与肥胖、睾酮水平、胰岛素抵抗的相关性分析[J].浙江医学,2016,38(16):1354-1357.
- [14] 乔俊英,宋丽,张艳丽,等.哮喘小鼠HMGB1/TLR4/NF- κ B信号通路及维生素D的作用[J].中国当代儿科杂志,2017,19(1):95-103.
- [15] 韩菲菲,陈国千.高迁移率族蛋白B1细胞外释放及信号转导机制[J].医学研究生学报,2013,26(3):296-299.

(本文编辑 杨 瑛)