DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000850

高脂喂养下大鼠卵巢颗粒细胞的功能变化

李　聪，王炼炼，胡小靖
（重庆医科大学附属第一医院妇产科，重庆　400016）

【摘　要】**目的**：分析高脂血症与卵巢颗粒细胞的影响，了解对卵巢激素合成功能的改变。**方法**：高脂喂养大鼠至性成熟期，测定卵巢组织内颗粒细胞的形态改变，免疫组化和 Western blot 测定性激素受体和生长分化因子 9（growth differentiation factor-9，GDF-9）的蛋白水平改变。**结果**：高脂喂养后，颗粒细胞的出现病理性改变，其雌孕雄激素受体含量减少，GDF-9 在卵巢组织内表达减弱，说明高脂喂养后卵巢颗粒细胞功能的减弱。**结论**：高脂喂养后，颗粒细胞结构出现损伤性改变，激素合成功能下降，与高脂血症下排卵减弱的临床症状相符合，提示高脂血症影响卵巢排卵功能的不良作用可通过损伤颗粒细胞来实现。

【关键词】高脂血症；颗粒细胞；生长分化因子-9
【中图分类号】R715　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2015- 03-09

Changes of rats ovarian granular cells under high-fat fed state

Li Cong, Wang Lianlian, Hu Xiaojing
(*Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To understand the function of ovarian hormone synthesis change through the analysis of the change of hyperlipidemia and granulosa cells. ***Methods***: Rats under high-fat were fed to sexual mature. Ovarian granulosa cells were observed by transmission electron microscope, and sex hormone receptors and growth differentiation factor-9(GDF-9) changes in ovarian granulosa cells were detected by immunohistochemistry and Western blot. ***Results***: After high-fat diet, granule cell pathological changes being found; estrogen, progesterone and androgen receptors levels were reduced obviously; the expression of GDF-9 in ovarian tissues was weakened; ovarian cell function was declined. ***Conclusion***: After high-fat fed, the damage change of granular cell structure and the decline of hormone synthesis function are consistent with the clinical symptoms of weakened ovulation under hyperlipemia, suggesting the role of hyperlipidemia for weaken ovarian ovulation function by injuring granular cell.

【Key words】hyperlipidemia; granulosa cells; growth differentiation factor-9

多囊卵巢综合征（polycystic ovary syndrome，PCOS）是生育期女性最常见的内分泌紊乱和糖脂代谢异常的全身性疾病，也是不孕主要原因之一[1]。PCOS 的发生发展与高雄激素血症、胰岛素抵抗和脂代谢紊乱三大环节密切相关，肥胖和 PCOS 这两种疾病在流行病学中的相似性，提示高脂血症与高雄激素血症之间互为因果，可能是致 PCOS 发生发展的重要环节[2]，但相互作用机制不明。脂质作为甾体激素合成原料，高脂膳食后脂类摄取过多，势必影响卵巢激素的合成和分泌，影响雄激素受体（androgen receptor，AR）、雌激素受体（estrogen receptor，ER）、孕激素受体（progesterone receptor，PR）。他丁类降脂药物可明显抑制卵泡膜细胞的增生，改变雄激素的分泌[3]。雌孕激素合成和发挥功能主要存在于颗粒细胞，当颗粒细胞功能旺盛，可表现为雌孕激素受体的活性增强。在高脂环境下，卵巢组织作为脂质过氧化损失的可能靶器官之一，将出现这样的异常改变，势必影响体内激素的合成和分泌，从而导致异常的病理生理改变。为阐述这一可能性的理论基础，研究脂代谢紊乱中与高雄激素血症的内在联系，为 PCOS 的病因学提供清晰的理论依据。

作者介绍：李　聪，Emai：b05104@sina.com，
研究方向：妇科内分泌疾病的诊治。

基金项目：国家自然基金资助项目（编号：81100399）；重庆市科学委员会资助项目（编号：cstc2011jjA10040）。
优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160109.2132.044.html（2016-01-19）

1 材料与方法

1.1 SD 大鼠高脂血症模型的建立

选择雌性 SFP 级 SD 4 周龄大鼠断奶后，40 只随机平均分为 2 组，即普通喂养组、高脂喂养组(60%脂肪热量)；相同条件下喂养至 12 周；无 1 只大鼠死亡影响实验数据，均生长情况良好。每周测定体质量变化，总体高脂组大鼠体质量增加高于对照组。高脂资料由上海斯莱克实验动物有限责任公司标准化生产，运输。动物实验已通过重庆医科大学动物伦理委员会 Animal Care and Use Committee 审批。

1.2 电镜检测卵巢形态结构改变

水合氯醛麻醉大鼠，取卵巢组织 2.5%戊二醛前固定，漂洗，加入 1%锇酸后固定，漂洗，丙酮阶梯脱水，渗透包埋，超薄切片 0.5 mm × 0.3 mm，正染色，上级透射电镜观察。

1.3 免疫组织化学测定 AR、ER、PR、生长分化因子 9(growth differentiation factor-9，GDF-9)在卵巢组织中定位表达情况

水合氯醛麻醉大鼠，取双侧卵巢组织，4%多聚甲醛固定过夜，脱水包埋于石蜡中，切成 5 μm 的连续切片，加入用血清稀释液稀释的一抗，4 ℃存放 24~48 h；吸去抗体，加入 0.01 mol/L KPBS 稀释的的二抗，室温孵育 2 h。加入 ABC 复合物之类的抗体，室温孵育 2 h，加入显色液，进行免疫组织化学显色，上镜观察，以细胞质中出现棕色为阳性细胞。图像分析，选定 3 个视野，每个视野随机选取 5 个区域，由计算机采集不同细胞的棕色强度，经软件分析统计，最终判定各蛋白的表达水平。一抗购于 SantaCruz 公司。

1.4 Western blot 测定 GDF-9 的蛋白表达

将分离的卵巢组织提取总蛋白，测定蛋白浓度并变性，电泳，转移至 PVDF 膜，5%脱脂奶粉封闭，孵育一抗及二抗，化学发光法显影，分析 GDF-9 蛋白的相对表达含量。

1.5 统计方法

采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析，各组数据采用均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）形式描述，组间比较采用 t 检验，检验水准 α=0.05。

2 结 果

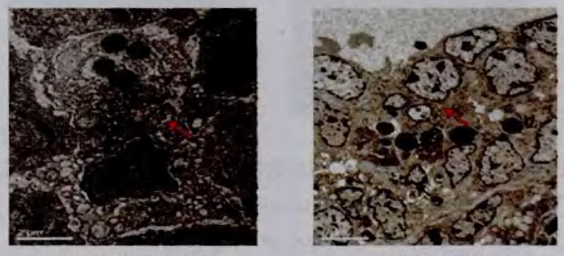
2.1 透射电镜下卵巢组织的变化

电镜结果示卵泡膜细胞与颗粒细胞明显的分界，颗粒细胞呈立方状排列，卵泡膜细胞梭形排列，颗粒细胞在高脂环境下出现了明显的病理学特征，细胞内线粒体肿胀，空泡化，病例征象明显，提示颗粒细胞功能出现了明显的损害。

图 1 可见：对照组颗粒细胞呈立方行，细胞核浆比例正常，细胞器旺盛；高脂喂养后颗粒细胞内细胞核分离，核浆比例失常，大量的线粒体膜肿胀，空泡化，分解，凋亡小体的出现。

2.2 性激素受体的免疫组化改变

免疫组化结果可见：对照组卵巢组织内，ER 和 PR 主要表达于颗粒细胞，卵泡膜细胞内少量表达；AR 主要表达在卵泡膜细胞，少量表达于颗粒细胞。高脂喂养后，可见颗粒细胞 ER、PR 和 AR 强度均不同程度减弱，差异有统计学意义。见图 2、表 1。



A. 对照组颗粒细胞　　B. 高脂组颗粒细胞

图 1 透射电镜下卵泡颗粒细胞内的结构变化（TEM，6 000 ×）

Fig.1 Structural changes of ovarian follicle cells in the transmission electron microscope (TEM, 6 000 ×)

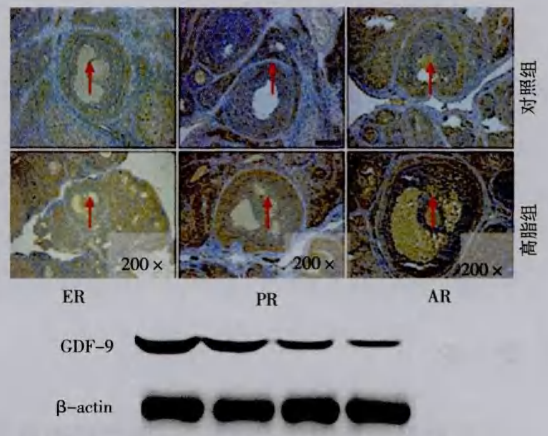


图 2 高脂喂养下卵巢组织性激素受体的表达变化

Fig.2 Changes of expression of sex hormone receptors in ovarian tissue in high fat diet

表 1 2 组 ER、PR、AR 比较

Tab.1 Comprison of ER, PR, AR between two groups

组别	ER	PR	AR
对照组	23.736 ± 2.461	23.226 ± 3.132	14.644 ± 0.704
高脂喂养组	18.223 ± 1.892	16.551 ± 1.564	11.346 ± 0.973
t 值	23.607	18.186	50.934
P 值	0.013	0.001	0.002

对照组可见 ER 均匀分布于颗粒细胞和卵泡膜细胞内，高脂组内 ER 表达集中在卵泡膜细胞，而卵丘和周围的颗粒细胞表达稀少。对照组中 PR 在颗粒细胞可见，在卵丘表达明显，高脂组少量表达。对照组 AR 在颗粒细胞可见少量黄色染色，呈阳性，高脂组内 AR 在颗粒细胞层也可见少量的黄色色素沉积，阳性表达为弱阳性。

2.3 GDF-9 的表达情况

在高脂喂养后的卵巢组织中发现：GDF-9 的在颗粒细胞的表达减弱，明显低于卵泡膜细胞，在卵巢组织中的总的GDF-9 水平也呈减弱，GDF-9 作为体现卵巢颗粒细胞功能的重要因子，其水平的降低提示颗粒细胞的活性减弱，颗粒细胞合成雌孕激素的功能减退。见图 3，表 2。



A. 对照组　　B. 高脂组

图 3　高脂喂养下 GDF-9 蛋白的表达改变（免疫组化，400×）

Fig.3　Changes of GDF-9 protein expression in high fat diet (immunohistochemisty, 400×)

图 3 可见，免疫组化结果可见，高脂喂养后颗粒细胞内 GDF-9 表现减弱，颗粒细胞呈棕色改变，卵泡膜细胞表达无明显改变，在 Western blot 结果可见，GDF-9 的表达低于对照组，差异有统计学差异，见表 2。

表 2　2 组 GDF-9 表达比较

Tab.2　Comprison of GDF-9 between two groups

组别	GDF-9
对照组	13.363 ± 1.142
高脂喂养组	9.498 ± 0.736
t 值	28.552
P 值	0.033

3　讨　论

在肥胖及短期内营养过剩，细胞大量摄取外源性的脂肪酸、甘油三酯及胆固醇，导致细胞自身脂肪合成增加，这些过度积累的细胞内脂滴导致组织特异性毒性反应可最终导致细胞调节异常而器官组织功能损害，即细胞脂毒性[4]。细胞内脂滴累积导致游离脂肪酸增加，氧化应激导致具有细胞毒性及高度反应性的脂质过氧化物生成增加，可导致细胞器如线粒体、内质网结构和功能受损，而致细胞合成功能障碍[5]。本实验形态学结果发现：高脂环境下卵巢组织内颗粒细胞出现明显的氧化损伤，表现为细胞器的损伤，以上的形态学结果为后面的分子水平研究带来了肯定的结构基础：高脂状态下，颗粒细胞受到明显的损伤，卵巢内卵泡的成熟也受到一定程度的抑制。

在颗粒细胞内，三大性激素受体稍有所减弱，统计学有差异，由于形态学发现颗粒细胞出现脂质过氧化损伤，进而可能导致颗粒细胞功能的降低，颗粒细胞为雌孕刺激的主要合成和分泌场所，并含有少量的雄激素合成过程。在本试验中同时发现：颗粒细胞在高脂喂养后损伤的同时，颗粒细胞内三大受体的表达均减弱，由于在细胞结构上的损伤，颗粒细胞已经出现明显的过氧化应激，导致卵巢组织内卵泡成熟障碍，优势卵泡减少，与本实验形态学结果相一致。

GDF-9 被认为是卵母细胞分泌的促细胞分裂剂。主要表达于颗粒细胞。是颗粒细胞功能的重要标志，Salilew-Wondim 等[6]研究小鼠颗粒细胞 GDF-9 表皮生长因子受体（EGFR）胞外受体信号调节激酶 1/2（ERK1/2）信号通路的机制，GDF-9 可调节卵巢围排卵期的应答，而且 GDF-9 可诱导卵丘细胞扩张，但也有数据证明 GDF-9 不是卵丘细胞扩张的唯一因素[7]。本实验中对照组发现 GDF-9 主要表达于卵丘和颗粒细胞，卵泡膜细胞表达少，而当颗粒细胞受损时，其水平下降，明显于性激素受体在颗粒细胞的减少。Trombly 等[8]通过体外使用 17β 雌二醇培养窦前期颗粒细胞-卵母细胞复合物，发现用雌二醇培养的细胞相对于对照组卵丘细胞扩张更为明显，并且完整的卵母细胞或 GDF-9 的提供均能促进卵丘的扩张。Myllymaa 等[9]发现：小鼠卵泡早期 Gdf-9 核酸信使表达的下调会使卵泡的发育停滞，用睾酮培养新生小鼠卵巢发现，雄激素可通过其受体使 GDF-9 的表达下调，因此认为这可能是雄激素过多影响卵泡发育的机制之一。

在本实验中发现，高脂环境下，GDF-9 的蛋白表达减弱，与颗粒细胞形态学异常，性激素受体减退相互一致，完整的展示了高脂喂养后脂质过氧化应激对于卵巢组织内颗粒细胞的严重损伤。颗粒细胞研究制约和影像卵泡的发育和成熟，当没有足够的雌激素支持，卵泡的成熟和排卵受到严重抑制，早期出现卵泡发育不良及闭锁增加，早期多囊卵巢的改变，排卵障碍等卵巢组织的病理学变化，符合PCOS在卵巢组织的改变。提示高脂血症在 PCOS 的发生发展过程中的促进作为，但是否影响雄激素的合成和分泌，出现高雄激素血症的发生，需要进一步的继续研究。

参　考　文　献

[1]　Hu W, Qiao J. Expression and regulation of adipocyte fatty acid binding protein in granulosa cells and its relation with clinical characteristics of polycystic ovary syndrome[J]. Endocrine, 2011, 40(2): 196-202.

[2]　Caldwell AS, Middleton LJ, Jimenez M, et al. Characterization of reproductive, metabolic, and endocrine features of polycystic ovary syndrome in female hyperandrogenic mouse models[J]. Endocrinology, 2014,

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000739

C57BL/6J小鼠急性足肿胀炎症模型的建立及指标评价

孙 韬[1],王春霞[1],李东海[2],赵 谊[1],曾婷婷[1]
（兰州市第一人民医院 1. 检验科;2. 病理科,兰州 730050）

【摘 要】**目的**:建立 C57BL/6J 小鼠急性足肿胀炎症模型进行模型指标评价。**方法**:将 24 只 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为 3 组,即正常组、模型组和吲哚美辛对照组。采用角叉菜胶法诱导模型组和吲哚美辛对照组小鼠发病建立急性足肿胀炎症模型。正常组小鼠不做任何处理。各组分别于注射角叉菜胶后 1、2、3、4、5、6 h 测量足趾厚度,随后处死小鼠取血清标本进行炎性因子检测,取足部组织进行病理学观察。**结果**:致炎 1 h 后模型组小鼠足部开始肿胀,2 h 后肿胀明显,5 h 后达到肿胀高峰。与模型组相比,吲哚美辛对照组则在 2 h 明显抑制肿胀(P=0.004),抑制作用持续到 6 h(P=0.000)。正常组小鼠无明显变化;模型组较吲哚美辛对照组和正常组小鼠血清肿瘤坏死因子-α(tumour necrosis factor-α,TNF-α)和白介素-1β(interleukin-1β,IL-1β)都明显升高(P=0.000);模型组小鼠足趾病理切片见大量中性粒细胞浸润,吲哚美辛对照组小鼠见少量中性粒细胞浸润,正常组小鼠足部病理未见明显异常。**结论**:C57BL/6J 小鼠急性足肿胀炎症模型方法可靠、可重复性较高以及阳性对照药物吲哚美辛抗足肿胀效果明显,可适用于抗炎药物的常规筛选及评价。足趾厚度改变、血清炎性因子 TNF-α 和 IL-1β 升高以及炎症部位病理改变是评价急性足肿胀炎症模型的重要指标。

【关键词】炎症模型;C57BL/6J 小鼠;足肿胀
【中图分类号】R965.1 【文献标志码】A 【收稿日期】2015-04-16

Establishment and evaluation of acute paw edema inflammation model of C57BL/6J mice

Sun Tao, Wang Chunxia, Li Donghai, Zhao Yi, Zeng Tingting
(1. Department of Clinical Laboratory, 2. Department of Pathology, The First People's Hospital of Lanzhou)

【Abstract】***Objective***: To establish and evaluate acute paw edema inflammation model of C57BL/6J mice. ***Methods***: Twenty-four cases of C57BL/6J male mice were randomly divided into 3 groups. The normal group did not receive any treatment; the other two groups were induced to acute inflammation model by carrageenan. The thickness of the paw was measured respectively at 1, 2, 3, 4, 5, 6 hours after the injection of carrageenan. Then the mice were executed, the serum samples were taken

作者介绍:孙 韬,Email:stsyd17d@163.com,
研究方向:生物化学与分子生物学。
通信作者:王春霞,Email:wangchxsh@163.com。
基金项目:兰州市卫生科技发展计划资助项目(编号:LZWSKY2014-1-05)。
优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150805.1550.016.html (2015-08-05)

155(8):3146-3159.

[3] Chang HM, Cheng JC, Taylor E, et al. Oocyte-derived BMP15 but not GDF9 down-regulates connexin43 expression and decreases gap junction intercellular communication activity in immortalized human granulosa cells[J]. Mol Hum Reprod, 2014, 20(5): 373-383.

[4] Vasconcelos GL, Saraiva MV, Costa JJ, et al. Effects of growth differentiation factor-9 and FSH on in vitro development, viability and mRNA expression in bovine preantral follicles[J]. Reprod Fertil Dev, 2013, 25(8): 1194-1203.

[5] Nonis D, McTavish KJ, Shimasaki S. Essential but differential role of FOXL2wt and FOXL2C134W in GDF-9 stimulation of follistatin transcription in cooperation with Smad3 in the human granulosa cell line COV434[J]. Mol Cell Endocrinol, 2013, 372(1): 42-48.

[6] Salilew-Wondim D, Ahmad I, Gebremedhn S, et al. The expression pattern of microRNAs in granulosa cells of subordinate and dominant follicles during the early luteal phase of the bovine estrous cycle[J]. PLoS One, 2014(9): e106795.

[7] Teede H, Deeks A, Moran L. Polycystic ovary syndrome: a complex condition with psychological, reproductive and metabolic manifestations that impacts on health across the lifespan[J]. BMC Med, 2010, 8(6): 41-45.

[8] Trombly DJ, Woodruff TK, Mayo KE. Roles for transforming growth factor beta superfamily proteins in early folliculogenesis[J]. Semin Reprod Med, 2009, 27(1): 14-23.

[9] Myllymaa S, Pasternack A, Mottershead DG, et al. Inhibition of oocyte growth factors in vivo modulates ovarian folliculogenesis in neonatal and immature mice[J]. Reproduction, 2010, 139(3): 587-598.

（责任编辑:冉明会）