

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2021.08.006
文章编号: 1005-8982 (2021) 08-0027-09

实验研究·论著

雌性母鼠高脂肪暴露对子代糖脂代谢、卵巢功能的影响及与多囊卵巢综合征发病的关系研究*

古兰·托合提木拉提¹, 叶尔努尔·吐苏甫汗², 马玉兰¹, 玛依努尔·尼亚孜¹

(1. 新疆维吾尔自治区人民医院医院 生殖医学科, 新疆 乌鲁木齐 830001;
2. 新疆医科大学第二附属医院 影像中心, 新疆 乌鲁木齐 830063)

摘要: 目的 研究雌性母鼠高脂肪暴露对子代小鼠糖、脂代谢, 卵巢功能的影响及与多囊卵巢综合征(PCOS)发病的关系。**方法** 将45只受孕SD鼠根据随机数字表法分为宫内高脂肪膳食组(HFI组)、宫内及哺乳期高脂肪膳食组(HFII组)和正常膳食组(NC组), 各15例。比较各组子代各阶段阴道涂片在性周期中占比, 空腹血糖(FBG), 空腹胰岛素(FINS), 胰岛素敏感指数(ISI), 胰岛素抵抗指数(HOMA-IR), 甘油三酯(TG), 静脉糖耐量试验(IPGTT), 胰岛素释放试验(IRT)结果, 卵巢形态学与脏器指数, 动情间期生殖内分泌水平[雌激素(E2)、孕激素(P)、促黄体生成素(LH)、睾酮(T)], 采用Logistic多元回归分析PCOS发生的影响因素。**结果** HFI组、HFII组动情期较NC组长($P < 0.05$), HFII组较HFI组长($P < 0.05$)。HFI组、HFII组FBG、FINS、HOMA-IR、TG水平较NC组高, ISI较NC组低($P < 0.05$); HFII组FBG、FINS、HOMA-IR、TG水平较HFI组高, ISI较HFI组低($P < 0.05$)。各组血糖、胰岛素比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。HFI组、HFII组雌仔卵巢脏器系数较NC组大, 且HFII较HFI组大($P < 0.05$)。HFI组、HFII组血清E2、LH较NC组低, 血清T较NC组高($P < 0.05$), HFII组血清E2、LH较HFI组低, 血清T较HFI组高($P < 0.05$), 各组雌仔血清P比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。HFI组、HFII组雌仔3 β -HSD1、3 β -HSD2、3 β -HSD5、17 β -HSD1及5 α -R1 mRNA较NC组高($P < 0.05$), HFII组较HFI组高($P < 0.05$)。经多因素一般Logistic回归分析, E2水平[OR=0.381 (95% CI: 0.339, 0.428)]是PCOS的保护因素, FBG[OR=2.740 (95% CI: 1.743, 4.306)]、TG[OR=3.527 (95% CI: 2.116, 5.879)]及T水平[OR=1.337 (95% CI: 1.294, 1.381)]是PCOS的危险因素。**结论** 高脂肪饮食暴露可引起子代糖、脂代谢异常, 并造成卵巢形态、功能改变, 是子代发生PCOS的相关危险因素, 其机制可能与调控雄激素转化酶的表达有关。

关键词: 代谢; 糖脂类; 卵巢功能试验; 多囊卵巢综合征

中图分类号: R589.1; R589.2

文献标识码: A

Effects of maternal high-fat diet exposure on glycolipid metabolism and ovarian function and its relationship with polycystic ovary syndrome in female offspring rats*

Gulan Tuohetumulati¹, Yeernuer Tusufuhan², Yu-lan Ma¹, Mayinuer Niyazi¹

(1. People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi, Xinjiang 830001, China; 2. The Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830063, China)

Abstract: Objective To study the effects of maternal high-fat diet exposure on glycolipid metabolism and ovarian function and its relationship with polycystic ovary syndrome (PCOS) in female offspring rats. **Methods**

收稿日期: 2020-11-20

* 基金项目: 国家自然科学基金地方项目 (No: 81460231)

Forty-five Sprague-Dawley (SD) pregnant female rats were selected and divided into high-fat diet during pregnancy group (HFI group, $n = 15$), high-fat diet during pregnancy and lactation group (HFII group, $n = 15$) and normal diet group (NC group, $n = 15$). The proportion of cells of each stage of sexual cycle in vaginal smears, fasting blood glucose (FBG), fasting insulin (FINS), insulin sensitivity index (ISI), insulin resistance index (HOMA-IR), triglyceride (TG), intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT), insulin release test (IRT), ovarian morphology and organ index, and the levels of serum reproductive endocrine indicators [estrogen (E2), progesterone (P), luteinizing hormone (LH), and testosterone (T)] during anoestrus in the female offspring were detected. Multivariate Logistic regression model was used to analyze the factors affecting the occurrence of PCOS. **Results** Compared with female offspring rats of NC group, female offspring rats of HFI group and HFII group had longer estrus ($P < 0.05$), while female offspring rats of HFII group had longer estrus than those of HFI group ($P < 0.05$). The levels of FBG, FINS, HOMA-IR, and TG in the female offspring rats of HFI and HFII groups were higher, and the ISI was lower in comparison to female offspring rats of NC group ($P < 0.05$); the levels of FBG, FINS, HOMA-IR and TG were higher but ISI was lower in female offspring rats of HFII group compared with female offspring rats of HFI group ($P < 0.05$). There were significant differences in blood glucose and insulin among the female offspring rats of distinct groups ($P < 0.05$). The organ index of ovary of female offspring was greater in HFI group and HFII group than that in NC group, and that in HFII group was even greater compared with HFI group ($P < 0.05$). The serum E2 and LH in the female offspring rats of the HFI group and HFII group were lower, but the serum T was higher in comparison to female offspring rats of NC group ($P < 0.05$); the serum levels of E2 and LH were lower whereas serum T level was higher in the female offspring rats of HFII group than those in the female offspring rats of HFI group ($P < 0.05$). Besides, compared with the female offspring rats of NC group, the 3β -HSD1, 3β -HSD2, 3β -HSD5, 17β -HSD1, and 5α -R1 mRNA were higher in the female offspring rats of HFI group and HFII group ($P < 0.05$), while those in female offspring rats of HFII group were higher compared with female offspring rats of HFI group ($P < 0.05$). Multivariate Logistic regression analysis suggested that E2 level [$\hat{OR} = 0.381$ (95% CI: 0.339, 0.428)] was a protective factor for PCOS, whereas FBG level [$\hat{OR} = 2.740$ (95% CI: 1.734, 4.306)], TG level [$\hat{OR} = 3.527$ (95% CI: 2.116, 5.879)], and T level [$\hat{OR} = 1.337$ (95% CI: 1.294, 1.381)] were risk factors for PCOS in female offspring rats ($P < 0.05$). **Conclusions** Exposure to a high-fat diet can cause abnormal glucose and lipid metabolism and changes in ovarian morphology and function of female offspring rats. Thus, maternal high-fat diet exposure is a risk factor for female offspring PCOS, and its mechanism may be related to the dysregulation of androgen-converting enzymes.

Keywords: metabolism; glycolipids; ovarian function tests; polycystic ovary syndrome

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 在育龄妇女中发病率为 5% ~ 10%, 是引起不孕、月经异常等的主要原因^[1]。由于 PCOS 内分泌异常涉及卵巢、下丘脑、肾上腺、垂体等多个器官, 其生化改变、发病机制、临床表现异质性较高, 确切病因尚未阐明^[2]。最近一项研究发现, 维吾尔族女性患者 BMI 较高、体内具有高雄激素的表现者, 后代更易患 PCOS, 提示肥胖与 PCOS 发病率有关, 但其发病机制尚不明确^[3-4]。目前关于 PCOS 的研究较多, 但主要基于在不孕门诊就诊的育龄期女性, 对青春期患者关注不足, 且受伦理的限制, 对宫内环境因素致病作用的报道较少。本研究探讨异常糖、脂代谢对子代小鼠卵巢功能与 PCOS 发病率的机制与相关性, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 主要试剂、仪器

Trizol (北京艾德莱生物科技有限公司), M-MLV Reverse Transcriptase (RNase H)、 $5 \times$ RT Reaction Buffer、ddH₂O (DNase/RNase Free) (美国 Genecopoeia 公司), RNase Inhibitor、dNTP Mixture (北京全氏金生物技术有限公司), $50 \times$ ROX Reference Dye、 $2 \times$ All-in-one tm qPCR Mix (美国 VAZYME 公司), Ex Taq TM、DL2000 DNA Marker (日本 TaKaRa 株式会社), 引物由北京擎科新业生物技术有限公司合成; 760 型全自动生化检测仪 (日本日立株式会社), 快速血糖仪 (瑞士罗氏公司), 离心机 (美国 Eppendorf 公司), 电子秤 (上海呈丰衡器有限公司), RM 2016 轮转式病理切片机 (德国

Leica公司), 切片刀(日本羽毛公司, R35一次性刀片), JK-6生物组织摊烤片机(武汉俊杰电子有限公司), 载玻片及盖玻片(江苏世泰实验器材有限公司), BX53型生物显微镜(日本奥林巴斯株式会社), QuantStudio 6型实时荧光定量PCR仪(美国ABI公司), 分光光度计(上海舜宇恒科学仪器有限公司), 电热恒温水浴锅(北京市长风仪器仪表有限公司), 微波炉(韩国LG公司), AJY-0501型超级纯水仪(美国艾科浦公司), pH计(德国Mettler-Toledo GmbH公司), 电子天平称(北京赛多利斯仪器系统有限公司), 紫外分析仪(北京君意东方电泳设备有限公司)。

1.2 实验动物

4周龄SD鼠(新疆医科大学动物实验中心)[实验动物许可证号: SCXK(新)20130001]。SD鼠适应性喂养1周后, 按雌雄3:1合笼, 环境温度20~23℃, 湿度40%~60%, 自由进水, 每日光照12h, 噪音<60dB。次日清晨观察各笼雌鼠有无阴道栓脱落, 如同一载玻片有3处不同视野发现精子计为阳性, 当日记为妊娠第1天, 未妊娠者继续合笼饲养, 合笼2周末妊娠者放弃。期间给予的普通饲料购自新疆医科大学动物实验中心, 热量分配: 糖类62%、脂肪13%、蛋白质25%。

1.3 分组

雌鼠受孕后随机分为宫内高脂肪膳食组(HFI组)、宫内及哺乳期高脂肪膳食组(HFII组)和正常膳食组(NC组), 每组15只。NC组全程给予普通饲料, HFI组妊娠期给予高脂肪饲料, HFII组妊娠期、哺乳期均给予高脂肪饲料。饲料均购自新疆医科大学动物实验中心, 普通饲料的热量分配: 糖类62%、脂肪13%、蛋白质25%, 常温保存。高脂肪饲料的热量分配: 糖类20%、脂肪60%、蛋白质20%, 置入-20℃冰箱保存。

1.4 方法

每天观察雌鼠妊娠及产子情况。出生后每周测仔的体重, 第3周时离乳并雌雄分笼, 弃雄仔。每笼养5~6只, 第4周起检查雌仔阴道细胞涂片, 1次/d, 直至实验结束。操作方法: 用沾有生理盐水的棉签, 于每日早晨轻轻插入大鼠阴道后缓慢转动, 获取黏液标本, 细胞涂片, 自然干燥。使用瑞士姬姆萨染色, 镜下观察。动情前期: 可见

大量圆形有核上皮细胞, 少量角化上皮细胞; 动情期: 可见大量角化上皮细胞, 少量圆形有核上皮细胞; 动情后期: 可见角化上皮细胞及大量白细胞。动情间期: 可见少量白细胞, 有核扁平上皮细胞及少量黏液。

1.4.1 空腹血糖、血清胰岛素测定 各组雌仔6周时夜间禁食12h, 次日行尾部取血1ml, 即刻采用血糖仪及配套试纸测定静脉全血葡萄糖水平为空腹血糖(fasting blood glucose concentration, FBG)。取血后4℃下静置1h, 以5000r/min离心5min, 取上清, -80℃冷藏, 采用双抗体夹心ELISA法测血清空腹胰岛素水平(fasting serum insulin concentration, FINS)。计算胰岛素敏感指数(insulin sensitivity index, ISI): $ISI=1/(FBG \times FINS)$, 胰岛素抵抗指数(homeostasis model assessment-insulin resistance index, HOMA-IR) = $(FBG \times FINS)/22.5$ 。采用全自动生化分析仪测定甘油三酯(Triglyceride, TG)水平。

进行静脉糖耐量试验(IPGTT)和胰岛素释放试验(IRT), 用20%葡萄糖按2g/kg腹腔注射, 葡萄糖负荷15min、30min、60min及120min后, 取尾静脉血0.5ml, 即刻测血糖、胰岛素水平。

1.4.2 动物处理、生殖内分泌水平检测 10%水合氯醛(4ml/kg)腹腔注射麻醉后, 开腹, 迅速取卵巢组织, 用电子天平称测量卵巢湿重, 并计算脏器系数, 脏器系数=脏器的重量(g)/体重(100g), 再置于4%多聚甲醛中固定。常规脱水, 石蜡包埋, 5μm厚度切片, 常规脱蜡, 水化, 苏木精5min, 伊红衬染2min, 脱水, 透明, 封片, 显微镜下观察各组大鼠的卵巢形态学变化。

暴露胸部, 注射器在心脏取血, 分离血清, 置于-20℃保存待测。采用放射免疫法测定血清雌激素(E2)、孕激素(P)、促黄体生成素(LH)、睾酮(T)水平。

1.4.3 实时荧光定量聚合酶链反应检测脂肪组织雄激素转化酶的表达 取皮下脂肪和内脏脂肪组织, 通过实时荧光聚合酶链反应(qRT-PCR)检测雄激素转化酶3β羟类固醇脱氢酶1(3β-HSD1)、3β羟类固醇脱氢酶2(3β-HSD2)、3β羟类固醇脱氢酶5(3β-HSD5)、17β羟类固醇脱氢酶1(17β-HSD1)、5α还原酶1(5α-R1)mRNA相对表达量。

取-80℃冰箱保存的新鲜冷冻组织，重量约为100 mg，加入1 ml Trizol 试剂，用匀浆器研磨成浆，移至无RNase的1.5 ml EP管中，裂解10 min。加入200 μl 氯仿，剧烈颠倒混匀数次，室温放置5 min。4℃、12 000 r/min 离心15 min，可见分成上(RNA)、中(蛋白)、下(DNA)三相。转移上层水相(约400 μl)于另一新1.5 ml EP管中，加入400 μl 异丙醇，混匀后室温静置10 min。4℃、12 000 r/min 离心10 min，管底可见白色的RNA沉淀。弃上清，加入无RNase的75%乙醇1 ml，涡旋混匀后，4℃、10 000 r/min 离心5 min，并重复1次。弃上清，空气中干燥RNA沉淀5~10 min，将沉淀溶于20 μl 的DEPC水中。取溶解后的RNA 2 μl 用微量分光光度计测定OD260、OD280，计算OD260/OD280值和RNA的纯度、浓度。根据

OD260/OD280 估测 RNA 质量，比值在 1.8~2.0 满足实验要求。将总 RNA 放于-80℃冰箱内保存以备。qRT-PCR 引物序列见表 1，取上述 RNA 3.199 μg，加入寡聚核苷酸引物 2 μl、浓度均为 2.5 mmol/L 的脱氧核糖核苷三磷酸混合物 4 μl、PCR 缓冲液 4 μl、逆转录酶 1 μl、RNA 抑制剂 0.5 μl，加入无 RNA 酶水至 20 μl 进行逆转录反应，逆转录成 cDNA，反应条件：25℃温育 5 min，50℃温育 15 min，85℃加热 5 min，4℃冷却 10 min。取上述 cDNA 4 μl，加入上下游引物各 0.4 μl、SYBR Green (荧光插入染料)/荧光素 qPCR 预混液 10 μl、水 5.2 μl，进行 qRT-PCR，检测各目的基因相对表达量。反应条件：50℃预变性 2 min，95℃变性 10 min，95℃退火 30 s，60℃延伸 30 s，共 40 个循环。绘制熔解曲线，最终数据以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析。

表 1 引物序列

基因	引物序列	引物长度/bp
<i>β-action</i>	正向: 5'-CACGATGGAGGGCCCGACTCATC-3' 反向: 5'-TAAAGACCTCTATGCCAACACACT-3'	240
<i>3β-HSD1</i>	正向: 5'-GACAAAGCCCAAGGTGACAAT-3' 反向: 5'-CTGGGTAGGACATGTGAGACA-3'	129
<i>3β-HSD2</i>	正向: 5'-AGGGACAAGCATCAAGGTGA-3' 反向: 5'-CTGTGACATCAATGAGGGCG-3'	119
<i>3β-HSD5</i>	正向: 5'-CCATACCCATACAGCAAAAGGA-3' 反向: 5'-GCTGTTCTTCTTGAGTGTCTA-3'	171
<i>17β-HSD1</i>	正向: 5'-CGCTACTTCTCCACAAACCG-3' 反向: 5'-GGGAGACAAATGAGGGCTCT-3'	188
<i>5α-R1</i>	正向: 5'-GCTTTGCCCTGTGTTACTG-3' 反向: 5'-TGATGGTGTCTGCTTCGCTCT-3'	253

1.5 观察指标

统计雌鼠一般情况，比较各组子代小鼠各阶段阴道涂片在性周期中占比，比较FBG、FINS、ISI、HOMA-IR、TG水平，比较IPGTT、IRT试验结果，比较卵巢形态与脏器指数，比较动情间期生殖内分泌，分析发生PCOS的影响因素。

1.6 统计学方法

数据分析采用SPSS 22.0统计软件。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示，比较用单因素方差分析或重复测量设计的方差分析，进一步的两两比较用LSD-*t*检验；计数资料以率(%)表示，比较用 χ^2 检验；影响因素的分析采用多因素 Logistic

回归模型。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 雌鼠一般情况

4周龄SD雌鼠54只及雄鼠18只，适应性喂养1周后，45只雌鼠成功妊娠。HF1组共产雌仔42只，HF2组共产雌仔48只，NC组共产雌仔50只，最终各组均随机纳入15只雌仔作为实验对象。各组小鼠实验过程中均发育良好，体毛润泽，行为无明显差异，反应灵活。

2.2 各组雌仔阴道涂片在性周期中占比比较

各组雌仔动情前期、动情期、动情间期占比

比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), HFI组、HFII组动情期较NC组长 ($P < 0.05$), HFII组较HFI组长 ($P < 0.05$)。见表2。

表2 各组子代小鼠阴道涂片在性周期中占比比较 ($n=15, \bar{x} \pm s$)

组别	动情前期	动情期	动情间期
HFI组	0.18 ± 0.01 ^①	0.40 ± 0.05 ^①	0.42 ± 0.02 ^①
HFII组	0.14 ± 0.01 ^{①②}	0.53 ± 0.06 ^{①②}	0.33 ± 0.01 ^{①②}
NC组	0.25 ± 0.02	0.28 ± 0.04	0.47 ± 0.02
F值	232.500	91.364	251.667
P值	0.000	0.000	0.000

注: ①与NC组比较, $P < 0.05$; ②与HFI组比较, $P < 0.05$ 。

2.3 各组雌仔FBG、FINS、ISI、HOMA-IR及TG比较

各组雌仔FBG、FINS、ISI、HOMA-IR及TG比

较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), HFI组、HFII组FBG、FINS、HOMA-IR、TG水平较NC组高, ISI较NC组低 ($P < 0.05$); HFII组FBG、FINS、HOMA-IR、TG水平较HFI组高, ISI较HFI组低 ($P < 0.05$)。见表3。

2.4 各组雌仔IPGTT不同时间点血糖、胰岛素比较

各组雌仔IPGTT 15 min、30 min、60 min和120 min的血糖、胰岛素比较, 经重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点间血糖、胰岛素有差异 ($F=67.661$ 和 10.505 , 均 $P=0.000$); ②各组血糖、胰岛素有差异 ($F=84.139$ 和 16.942 , 均 $P=0.000$)。③各组血糖、胰岛素变化趋势有差异 ($F=51.333$ 和 15.264 , 均 $P=0.000$)。见表4、5和图1、2。

表3 各组雌仔FBG、FINS、ISI、HOMA-IR及TG比较 ($n=15, \bar{x} \pm s$)

组别	FBG/(mmol/L)	FINS/(mIU/L)	ISI	HOMA-IR	TG/(mmol/L)
HFI组	4.61 ± 0.41 ^①	20.45 ± 2.02 ^①	0.011 ± 0.001 ^①	4.19 ± 0.04 ^①	1.09 ± 0.23 ^①
HFII组	6.41 ± 0.46 ^{①②}	23.91 ± 2.15 ^{①②}	0.007 ± 0.001 ^{①②}	6.81 ± 0.04 ^{①②}	1.62 ± 0.35 ^{①②}
NC组	3.79 ± 0.36	18.86 ± 1.64	0.014 ± 0.001	3.18 ± 0.03	0.70 ± 0.12
F值	158.700	26.335	185.000	38526.95	50.556
P值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: ①与NC组比较, $P < 0.05$; ②与HFI组比较, $P < 0.05$ 。

表4 各组雌仔不同时间点血糖比较 ($n=15, \text{mmol/L}, \bar{x} \pm s$)

组别	15 min	30 min	60 min	120 min
HFI组	11.96 ± 1.23	9.46 ± 0.86	7.85 ± 0.74	5.31 ± 0.70
HFII组	14.94 ± 1.42	12.01 ± 1.28	10.01 ± 1.30	7.51 ± 1.05
NC组	9.89 ± 0.87	7.41 ± 0.68	4.88 ± 0.90	4.38 ± 0.82

表5 各组雌仔不同时间点胰岛素比较 ($n=15, \text{mIU/L}, \bar{x} \pm s$)

组别	15 min	30 min	60 min	120 min
HFI组	22.17 ± 2.15	38.79 ± 2.67	28.44 ± 1.74	22.79 ± 1.62
HFII组	21.34 ± 1.98	43.86 ± 3.39	31.39 ± 2.85	24.13 ± 2.13
NC组	18.86 ± 2.04	30.55 ± 3.42	25.81 ± 3.09	20.06 ± 2.35

2.5 各组雌仔卵巢形态

NC组卵巢组织形态、卵泡正常; HFI组、HFII组均可见卵巢组织形态学出现异常变化, 白膜增厚, 黄体减少, 多个不同发育阶段的卵泡及囊性卵泡。NC组雌仔卵巢脏器系数为 ($1.58 \pm$

0.13) $\times 10^{-3}$, HFI组为 (2.40 ± 0.14) $\times 10^{-3}$, HFII组为 (3.34 ± 0.16) $\times 10^{-3}$, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=562.029$, $P=0.000$), HFI组、HFII组较NC组大, 且HFII较HFI组大 ($P < 0.05$)。见图3。

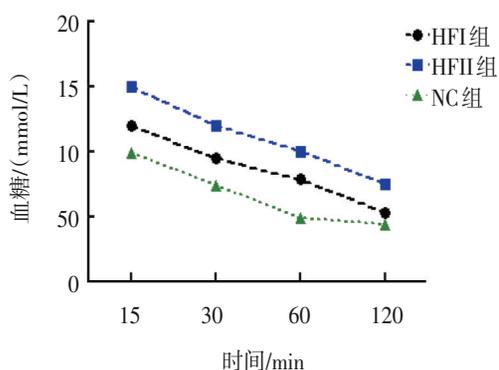


图 1 各组雌仔不同时间点血糖变化趋势

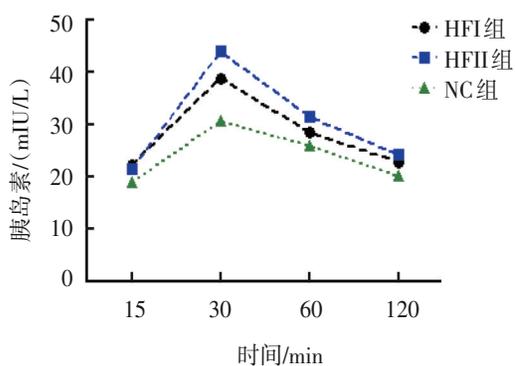


图 2 各组雌仔不同时间点胰岛素变化趋势

2.6 各组雌仔动情间期生殖内分泌水平比较

各组雌仔血清 E2、LH 及 T 比较，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，HFI 组、HFII 组血清 E2、LH 较 NC 组低，血清 T 较 NC 组高 ($P < 0.05$)，HFII 组血清 E2、LH 较 HFI 组低，血清 T 较 HFI 组高 ($P < 0.05$)。各组雌仔血清 P 比较，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 6。

2.7 各组雌仔脂肪组织雄激素转化酶水平比较

各组雌仔 3β -HSD1、 3β -HSD2、 3β -HSD5、

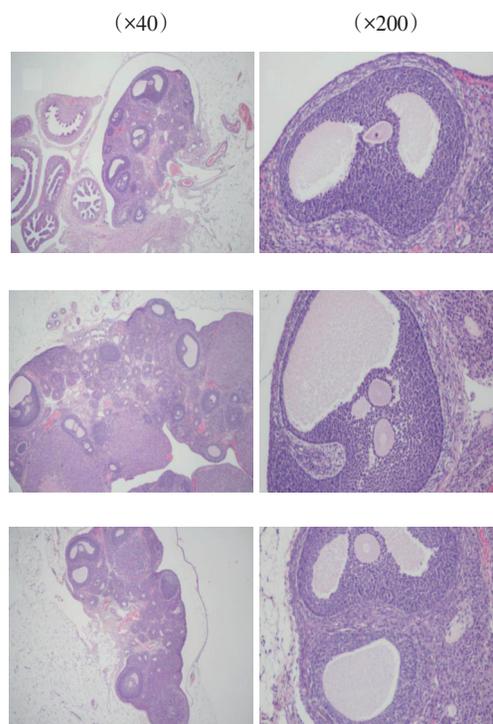


图 3 卵巢组织 HE 染色

17β -HSD1 及 5α -R1 mRNA 相对表达量比较，经方差分析，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，HFI 组、HFII 组较 NC 组高 ($P < 0.05$)，HFII 组较 HFI 组高 ($P < 0.05$)。见表 7。

2.8 PCOS 影响因素的多因素 Logistic 分析结果

以是否发生 PCOS 作为因变量，以 FBG、FINS、ISI、HOMA-IR、TG、E2、LH、T 作为自变量，进行多因素一般 Logistic 回归分析。结果显示：E2 水平是 PCOS 的保护因素 ($P < 0.05$)，FBG、TG 及 T 水平是 PCOS 的危险因素 ($P < 0.05$)。见表 8。

表 6 各组雌仔动情间期生殖内分泌水平比较 ($n=15, \bar{x} \pm s$)

组别	E2/(pmol/L)	P/(nmol/L)	LH/(u/L)	T/(ng/ml)
HFI 组	19.77 ± 5.26 ^①	415.29 ± 18.73	2.02 ± 0.44 ^①	7.98 ± 0.48 ^①
HFII 组	15.83 ± 4.37 ^{①②}	420.03 ± 22.06	1.49 ± 0.51 ^{①②}	9.98 ± 0.60 ^{①②}
NC 组	26.47 ± 4.19	418.55 ± 20.45	3.15 ± 0.46	5.85 ± 0.54
F 值	20.245	0.211	48.625	217.634
P 值	0.000	0.811	0.000	0.000

注：①与 NC 组比较， $P < 0.05$ ；②与 HFI 组比较， $P < 0.05$ 。

表7 各组雌仔脂肪组织雄激素转化酶水平比较 ($n=15, \bar{x} \pm s$)

组别	3 β -HSD1	3 β -HSD2	3 β -HSD5	17 β -HSD1	5 α -R1
HFI组	1.35 \pm 0.12	1.56 \pm 0.11	1.50 \pm 0.22	1.74 \pm 0.04	1.61 \pm 0.11
HFII组	1.67 \pm 0.14	1.97 \pm 0.13	2.05 \pm 0.34	2.32 \pm 0.05	2.21 \pm 0.10
NC组	1.01 \pm 0.11	0.99 \pm 0.08	1.13 \pm 0.20	1.00 \pm 0.02	1.03 \pm 0.04
F值	106.334	307.924	47.272	4377.33	861.013
P值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

表8 PCOS影响因素的多因素 Logistic 分析参数

自变量	<i>b</i>	<i>S_b</i>	Wald χ^2	P值	\hat{OR}	95% CI	
						下限	上限
FBG	1.008	0.464	4.718	0.029	2.740	1.743	4.306
TG	1.527	0.555	5.159	0.011	3.527	2.116	5.879
E2	-0.965	0.431	5.015	0.017	0.381	0.339	0.428
LH	0.922	0.592	2.424	0.102	2.514	1.816	3.479
T	0.290	0.105	7.642	0.000	1.337	1.294	1.381

3 讨论

PCOS 不仅可造成不孕,亦会增加糖尿病、妊娠期糖尿病、心血管疾病、子宫内膜癌等发病风险,因此研究其发病机制,对尽早发现、干预,并改善子代的代谢状态,保障子代的生殖健康意义重大^[5-6]。而复制符合本研究需要的动物模型是决定本研究能否成功的关键问题之一。前期的实验发现,高脂肪饮食中的脂肪含量高,小鼠的摄食量不高,且胎仔的死产率高,不能有效地复制模型,因而在本次实验中,改进了饮食结构,提供脂肪配方比例为 60% 的高脂饲料,既能保证高脂肪成分含量,又改善摄入饲料的口感,并联合具有国际 AAALAC 认证动物实验中心的新疆医科大学,解决了模型复制的困难,为实验顺利实施提供了坚实的基础。

以往有研究指出,高脂饮食引起的 PCOS 大鼠,血清 FBG、FINS、HOMA-IR 高于正常大鼠^[7]。XUE 等^[8]对 PCOS 大鼠应用降糖药物二甲双胍,发现大鼠多囊、高胰岛素血症的症状得到改善,从侧面反映 FBG 与 PCOS 发病有关。VONICA 等^[9]纳入了 15 例患有 PCOS 的白人妇女和 15 例年龄匹配的白人健康妇女,使用超高效液相色谱-四极杆飞行时间电喷雾质谱法进行脂质组学分析,发现高 TG 是

区分 PCOS、健康女性的有效指标,提示 TG 亦与 PCOS 有关。但母亲摄食高脂饮食对子代糖、脂代谢及 PCOS 发生的影响尚不明确。本研究发现 NC 组、HFI 组、HFII 组 FBG、FINS、HOMA-IR、TG 依次增高,ISI 依次降低,且与 NC 组相比,IPGTT 及 IRT 试验后,HFI 组、HFII 组 15 min、30 min 后血糖、胰岛素较高,且血糖、胰岛素高峰值增大,下降缓慢,曲线下面积较大,表明母亲高脂饮食可影响雌性子代糖和脂代谢、胰岛 β 细胞的功能。ZHANG 等^[10]研究发现,妊娠期糖尿病大鼠的子代 ISI 降低,HOMA-IR 增加。有观点认为,造成这一结果的原因是高脂饮食导致宫内高糖环境损伤子代胰岛细胞,加之子代出生后自身的葡萄糖水平对胰岛细胞刺激不够,致胰岛细胞生长发育受限,从而影响糖、脂代谢^[11-13]。亦有报道指出,宫内高糖可影响后代基因甲基化、组蛋白翻译和修饰,而基因甲基化、组蛋白翻译和修饰是最基础的基因表观遗传学修饰途径,可保持染色体稳定性,表观遗传修饰引起的“代谢性记忆”即使在后续血糖控制达标后,仍持续启动,并介导核内基因表达谱异常,从而从基因水平影响糖、脂代谢^[14-16]。

同时本研究还发现,HFI 组、HFII 组动情期较 NC 组长,动情前期、动情间期较 NC 组短,卵巢脏

器系数、血清T值较NC组大,血清E2、LH水平较NC组低,提示糖、脂代谢异常可影响卵巢功能,这可能是其介导PCOS发生的根本所在。ZHANG等^[17]采用脱氢表雄酮注射方法复制PCOS模型,发现加用45%和60%的高脂饮食均可导致雄激素过多、性周期不规则、多囊卵巢,表明高脂饮食可影响卵巢功能。PATEL等^[18]研究采用高脂饲料喂食青春期前雌性大鼠,发现大鼠糖耐量和FINS升高,HE染色可见囊性卵泡增多、颗粒细胞层减少、卵泡膜细胞层增厚等组织病理学改变,说明青春期前开始的高脂肪饮食会引起代谢紊乱和卵巢改变,与临床观察到的PCOS患者相似,从侧面支持本研究结论。卵巢功能异常可通过LH等生殖内分泌激素影响下丘脑-垂体-卵巢轴的正常功能,加重糖、脂代谢异常,糖、脂代谢异常又可影响卵巢功能,从而形成恶性循环,增加PCOS发病风险^[19]。

PCOS患者典型症状之一是高雄激素血症,而机体雄激素表达受雄激素转化酶的影响,但现阶段关于PCOS中雄激素转化酶表达的研究较少。 3β -HSD1、 3β -HSD2、 3β -HSD5、 17β -HSD1及 5α -R1均为雄激素转化酶,其中 3β -HSD1、 3β -HSD2、 3β -HSD5主要作用是催化脱氢表雄酮向雄烯二酮转化, 17β -HSD1可催化雄烯二酮向睾酮转化, 5α -R1可催化睾酮向双氢睾酮转化^[20]。张哲等^[21]研究显示, 17β -HSD1与E2、LH的合成具有相关性。本研究发现,NC组、HFI组和HFII组 3β -HSD1、 3β -HSD2、 3β -HSD5、 17β -HSD1及 5α -R1 mRNA相对表达量依次升高,提示异常糖、脂代谢可影响雄激素转化酶的表达,这可能是其诱导PCOS发生的一个机制。同时本研究还发现,E2是PCOS的相关保护因素,FBG、TG、T是PCOS的相关危险因素,提示以上因素与PCOS的发生有关。詹艳萍等^[22]报道显示,雌鼠妊娠期肥胖是子代成年期发生PCOS的一个高风险因素,而肥胖可导致糖、脂代谢异常,论证了本研究结论。以往关于母代高脂肪暴露对子代糖、脂代谢、卵巢功能、PCOS发病率的研究较少,且目前国内PCOS的研究主要基于不孕门诊就诊的育龄期女性,对青春患者关注不足。本研究除观察宫内高脂肪饮食暴露外,还探讨了哺乳期高脂肪饮食暴露对幼鼠的影响,可为幼年期干预、预防PCOS提供循证支

持,以便尽早发现、干预,可能会改善子代的代谢状态,保护卵巢功能,保障子代的生殖健康。同时既往采用高脂肪饮食暴露复制动物模型时,脂肪含量高,小鼠的摄食量不高,模型复制成功率低,增加了实验成本,本研究提供脂肪配方比例为60%的高脂饲料,有效解决了造模困难的问题,可为成功复制动物实验提供参考。此外,本研究证实,糖、脂代谢异常可影响雄激素转化酶的表达,佐证了这一结论的可靠性,为PCOS靶向干预提供了有力的证据。

综上所述,高脂肪饮食暴露可引起子代糖、脂代谢异常,并导致子代卵巢形态、功能发生改变,是子代发生PCOS的相关危险因素,其机制可能与调控雄激素转化酶的表达有关。

参考文献:

- [1] 李赛姣,周丹妮,李维,等. 颗粒蛋白前体在高脂饮食诱导的肥胖PCOS大鼠卵巢中的表达[J]. 生殖医学杂志, 2017, 26(9): 921-926.
- [2] HUANG R, XUE X, LI S, et al. Alterations of polyunsaturated fatty acid metabolism in ovarian tissues of polycystic ovary syndrome rats[J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(7): 3388-3396.
- [3] 潘静,张清华,姚丽艳. 新疆维吾尔族与汉族多囊卵巢综合征患者抗苗勒管激素水平与相关临床指标的相关性[J]. 临床与病理杂志, 2019, 39(2): 275-280.
- [4] 郑慧颖. 黄连素对多囊卵巢综合征大鼠高雄激素状态及StAR蛋白质、mRNA表达的影响[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2016: 6-17.
- [5] 张荔,戴咏梅. 多囊卵巢综合征患者孕早中期体重增加与妊娠期糖尿病的关系[J]. 江苏医药, 2017, 43(14): 1044-1045.
- [6] 中国医师协会内分泌代谢科医师分会. 多囊卵巢综合征诊治内分泌专家共识[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2018, 34(1): 1-7.
- [7] 赖毛华,马红霞,李娟,等. 电针对PCOS大鼠子宫内膜IRS1和IRS2 mRNA表达及胰岛素敏感性的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2016, 36(9): 1082-1086.
- [8] XUE J, LI X, LIU P, et al. Inulin and metformin ameliorate polycystic ovary syndrome via anti-inflammation and modulating gut microbiota in mice[J]. Endocr J, 2019, 66(10): 859-870.
- [9] VONICA CL, ILIE I R, SOCACIU C, et al. Lipidomics biomarkers in women with polycystic ovary syndrome (PCOS) using ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time of flight electrospray in a positive ionization mode mass spectrometry[J]. Scand J Clin Lab Invest, 2019, 79(6): 437-442.
- [10] ZHANG F, XIAO X, LIU D, et al. Increased cord blood angiotensin II concentration is associated with decreased insulin sensitivity in the offspring of mothers with gestational diabetes mellitus[J]. J Perinatol, 2013, 33(1): 9-14.

- [11] CALDWELL A S, MIDDLETON L J, JIMENEZ M, et al. Characterization of reproductive, metabolic, and endocrine features of polycystic ovary syndrome in female hyperandrogenic mouse models[J]. *Endocrinology*, 2014, 155(8): 3146-3159.
- [12] VOLK K M, POGREBNA V V, ROBERTS J A, et al. High-fat, High-Sugar diet disrupts the preovulatory hormone surge and induces cystic ovaries in cycling female rats[J]. *J Endocr Soc*, 2017, 1(12): 1488-1505.
- [13] van HOUTEN E L, VISSER J A. Mouse models to study polycystic ovary syndrome: a possible link between metabolism and ovarian function[J]. *Reprod Biol*, 2014, 14(1): 32-43.
- [14] 殷倩, 郝栋栋, 钟兴明, 等. 高雄激素PCOS大鼠模型中胰岛素受体基因甲基化分析[J]. *中国计划生育学杂志*, 2016, 24(2): 79-84.
- [15] 金芬品. AMHRII、INSR 基因DNA甲基化与PCOS表观遗传学研究[D]. 广州: 暨南大学, 2015: 10-23.
- [16] 唐华, 党伟, 魏颖莉, 等. miR-146a对父代高脂高糖饮食背景下子代新生鼠肝脏胰岛素受体基因表达的影响[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2019, 35(5): 404-409.
- [17] ZHANG H, YI M, ZHANG Y, et al. High-fat diets exaggerate endocrine and metabolic phenotypes in a rat model of DHEA-induced PCOS[J]. *Reproduction*, 2016, 151(4): 431-441.
- [18] PATEL R, SHAH G. High-fat diet exposure from pre-pubertal age induces polycystic ovary syndrome (PCOS) in rats[J]. *Reproduction*, 2018, 155(2): 141-151.
- [19] ZHOU J, WANG D, LUO X, et al. Melatonin receptor agonist piromelatine ameliorates impaired glucose metabolism in chronically stressed rats fed a high-fat diet[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2018, 364(1): 55-69.
- [20] MARCHAIS-OBERWINKLER S, XU K, WETZEL M, et al. Structural optimization of 2,5-thiophene amides as highly potent and selective 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 inhibitors for the treatment of osteoporosis[J]. *J Med Chem*, 2013, 56(1): 167-181.
- [21] 张哲, 王宏竹, 刘永惠, 等. 大鼠肾脏细胞17 β -HSD1的表达及参与性激素合成的能力[J]. *南方医科大学学报*, 2016, 36(2): 265-268.
- [22] 詹艳萍, 李银萍. 大鼠妊娠期肥胖对雌性子代发生PCOS的影响[J]. *热带医学杂志*, 2016, 16(10): 1231-1234.

(李科 编辑)

本文引用格式: 古兰·托合提木拉提, 叶尔努尔·吐苏甫汗, 马玉兰, 等. 雌性母鼠高脂肪暴露对子代糖脂代谢、卵巢功能的影响及与多囊卵巢综合征发病的关系研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2021, 31(8): 27-35.

Cite this article as: TUOHETIMULATI G L, TUSUFUHAN Y N, MA Y L, et al. Effects of maternal high-fat diet exposure on glycolipid metabolism and ovarian function and its relationship with polycystic ovary syndrome in female offspring rats[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2021, 31(8): 27-35.