

# Notch 信号通路介导的自噬改变在多囊卵巢综合征中的作用及机制研究\*

任楠楠<sup>1</sup>, 周 珊<sup>2</sup>, 刘红莉<sup>1△</sup>

(1. 西安市人民医院检验科 710004; 2. 西北妇女儿童医院生殖妇科, 西安 710039)

**[摘要]** **目的** 研究 Notch 信号通路在大鼠多囊卵巢综合征(PCOS)发生过程中对自噬发生的调控机制。**方法** 通过来曲唑 200  $\mu\text{g}/\text{d}$  灌胃的方式建立 PCOS 大鼠模型; 实验分为对照组、来曲唑干预组(200  $\mu\text{g}/\text{d}$ )、Jagged1 处理组、来曲唑+Jagged1 处理组, 21 d 建模成功后观察各组血清中雌二醇(E2)、促卵泡生长激素(FSH)水平的改变; HE 染色检测实验各组卵巢形态学变化; 运用 Western blot 检测各组卵巢组织中自噬相关蛋白 LC3 和 Beclin1 及 mTOR 信号通路、Notch 信号通路相关分子的表达改变。**结果** 与对照组相比, PCOS 模型组血清中 E2、FSH 水平显著降低, 卵巢组织形态学变化明显; 模型组呈现病理性的改变, 黄体结构较少, 卵泡大量扩张, 颗粒细胞层排列稀疏, 无放射冠及卵母细胞存在, 卵巢间质细胞出现增生; Western blot 检测发现 PCOS 模型组自噬相关蛋白 Beclin1、LC3 蛋白表达水平升高; Notch 信号通路也处于抑制状态, Notch1 和 Hes1 蛋白在模型组均低表达。运用 Notch 信号通路的激活剂 Jagged1 处理后能够改善 PCOS 的病理改变, 降低卵巢组织的自噬发生。**结论** Notch 信号通路介导的自噬改变参与了来曲唑诱导 SD 大鼠 PCOS 的病理进程。

**[关键词]** 多囊卵巢综合征; 自噬; Notch 信号通路; Beclin1; LC3; 大鼠

**[中图分类号]** R737.33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2021)01-0008-05

## Role and mechanism of autophagy mediated by Notch signaling pathway in polycystic ovary syndrome\*

REN Nannan<sup>1</sup>, ZHOU Shan<sup>2</sup>, LIU Hongli<sup>1△</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, Xi'an Municipal Fourth Hospital, Xi'an, Shaanxi 710004, China; 2. Department of Reproductive Medicine, Northwest Women and Children's Hospital, Xi'an, Shaanxi 710039, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the regulation mechanism of Notch signaling pathway on autophagy in the pathogenesis of polycystic ovary syndrome (PCOS) in rats. **Methods** The PCOS rat model was established by gavage of letrozole 200  $\mu\text{g}/\text{d}$ . The experiment was divided into the control group, the letrozole intervention group (200  $\mu\text{g}/\text{d}$ ), the Jagged1 + letrozole treatment group (200  $\mu\text{g}/\text{d}$ ). The changes of serum levels of estradiol (E2) and follicle-stimulating growth hormone (FSH) in each group were observed after successful modeling at 21 d. HE staining was used to detect the morphological changes of ovaries in each group. Western blot was used to detect the expression changes of autophagy related proteins LC3 and Beclin1, mTOR signaling pathway and Notch signaling pathway in ovarian tissues of each group. **Results** Compared with the control group, the serum levels of E2 and FSH in the PCOS group were significantly reduced, and the changes in ovarian histomorphology were obvious. The model group presented pathological changes, with less luteal structure, a large number of expanded follicles, sparse arrangement of granulosa cell layers, no presence of radiative corona and oocytes, and hyperplasia of ovarian stromal cells. Western blot analysis showed that the expression levels of autophagy-related proteins Beclin1 and LC3 increased in the PCOS model group. Notch signaling pathway was also inhibited, and both Notch1 and Hes1 proteins were under expressed in the model group. Treatment with Jagged1, an activator of Notch signaling pathway, can improve the pathological changes of PCOS, and reduce autophagy in ovarian tissues. **Conclusion** The changes of autophagy mediated by Notch signaling pathway participate in the pathological process of PCOS induced by letrozole.

**[Key words]** polycystic ovarian syndrome; autophagy; Notch signaling pathway; Beclin1; LC3; rat

\* 基金项目: 陕西省自然科学基金项目(2020JQ-459; 2019KJXX-090); 西安市第四医院孵化基金(FZ-49)。 作者简介: 任楠楠(1986-), 副主任技师, 硕士, 主要从事妇科检验方面的工作。 △ 通信作者, E-mail: liuhonglili@hotmail.com。

多囊卵巢综合征(polycystic ovarian syndrome, PCOS)是一种女性常见的生殖内分泌疾病,能够引起卵巢内颗粒细胞和卵泡细胞发育障碍,导致不孕和不良妊娠的结局<sup>[1-2]</sup>。研究表明,PCOS影响着5%~10%的育龄女性。PCOS主要临床表现为肥胖、血脂异常及胰岛素抵抗(IR)等。目前针对PCOS病理机制的研究较多,主要认为与基因的改变相关,例如一些合成激素分泌相关的基因、炎症因子、脂代谢相关基因及自噬相关基因等<sup>[3]</sup>。卵巢中的细胞反应可能是PCOS的最初病理机制,进而引起下丘脑-垂体-卵巢轴(hypothalamus-pituitary-ovary axis, HPO)紊乱,激素水平出现异常导致临床症状的产生。自噬是细胞发生的不同于凋亡的程序性死亡,过度的自噬对细胞来说无疑是一种损伤<sup>[4]</sup>。目前研究发现,卵巢中的颗粒细胞若发生过度自噬,则可能导致PCOS的发生。Beclin1蛋白分子是自噬发生的关键分子,是自噬泡形成的重要组成部分。Beclin1分子表达的水平能够间接反映细胞自噬的状态。调控自噬发生的信号通路较多,mTOR是最经典的一条通路,mTOR对自噬的发生能够起到负面的调控作用<sup>[5]</sup>。然而对于mTOR上游调控的机制仍未阐明,深入研究PCOS过程中卵巢细胞Notch信号通路的改变,观察Notch信号通路与mTOR相关分子的关系,阐明Notch信号通路对自噬表达水平的影响,将会为PCOS的防治提供理论依据和分子靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

SD大鼠(购自空军军医大学动物实验中心);来曲唑(江苏恒瑞医药);HE染色试剂(武汉谷歌生物公司);戊巴比妥钠(北京化工厂);Jagged1(美国Sigma公司);噻唑蓝(MTT)、RMPI-1640培养基(美国Sigma公司);Actin、Beclin 1、mTOR、p70s6k、LC3、Hes1和Notch 1抗体(英国Abcam公司);二甲亚砜(DMSO,美国Gibco公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 SD大鼠PCOS模型的建立

运用MALIQUEO等<sup>[6]</sup>的方法,用来曲唑200 $\mu\text{g}/\text{d}$ 灌胃的方式建立PCOS大鼠模型。将体质量约为200g的SPF级雌性SD大鼠40只,分为对照组、来曲唑干预组(200 $\mu\text{g}/\text{d}$ )、Jagged1处理组、来曲唑+Jagged1处理组。SD大鼠每天保持光照12h,环境温度控制在20~24 $^{\circ}\text{C}$ ,湿度范围是60% $\pm$ 5%,自由进食和饮水。

#### 1.2.2 血清样本及卵巢组织的采集

实验各组SD大鼠末次灌胃给药后禁食过夜,次日称量各组SD大鼠体质量,用2%戊巴比妥钠麻醉后,剥离胸腔,暴露心脏,从心房抽取静脉血,室温放置30min,2500r/min离心15min,取上清液分装冻存在-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。抽取静脉血后,在SD大鼠

腰椎背侧用75%乙醇消毒,双侧分别做一1cm左右的切口,取出SD大鼠的双侧卵巢。一侧用4%多聚甲醛固定,另一侧放于离心管中存入-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

#### 1.2.3 激素水平的测定

通过化学发光法对各组SD大鼠血清中的雌二醇(E2)、促卵泡生长激素(FSH)、促黄体生成素(LH)进行检测。具体方法按照试剂盒说明书进行,每组各设两个复孔,保证结果相对偏差在 $\pm$ 15%范围内,变异系数小于15%。

#### 1.2.4 卵巢HE染色

将在10%甲醛溶液中浸泡24h以上的卵巢组织,常规石蜡包埋进行组织切片,厚度为3~4 $\mu\text{m}$ ,行HE染色:(1)二甲苯脱蜡;(2)乙醇水化;(3)苏木精染色;(4)1%盐酸乙醇分化,自来水冲洗10~20s;(5)伊红染色;(6)脱水,透明,封片。

#### 1.2.5 Hela细胞培养及MTT检测

Hela细胞常规37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%的CO<sub>2</sub>、饱和湿度孵箱培养。细胞分为4组:空白对照组、白头翁皂苷B4处理组(20mg/mL)、Jagged1处理组、Jagged1+白头翁皂苷B4处理组(20mg/mL)。细胞接种在96孔板中,待细胞完全贴壁处于良好状态下每孔加入20 $\mu\text{L}$ 浓度是5mg/mL的MTT溶液,继续放入细胞培养箱孵育4h,用移液器分别吸去各孔中的上清液,每孔加入150 $\mu\text{L}$ DMSO,运用酶标仪检测各孔的吸光度值,计算细胞活力。

#### 1.2.6 Western blot检测自噬相关蛋白和信号通路

将4组处理的Hela细胞分别运用蛋白提取试剂盒提取蛋白样品,运用紫外分光光度计进行蛋白浓度定量,蛋白浓度配平后放入-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。进行凝胶电泳(恒流条件下实施电压80V,电泳时间为120min),电转(恒压条件下实施电流250mA,电转时间为90min)。4 $^{\circ}\text{C}$ 一抗( $\beta$ -actin、Beclin 1、LC3、Hes1、Notch 1)孵育16h,二抗室温孵育2h,用ECL发光法显色。各组以 $\beta$ -actin蛋白作为内参。

### 1.3 统计学处理

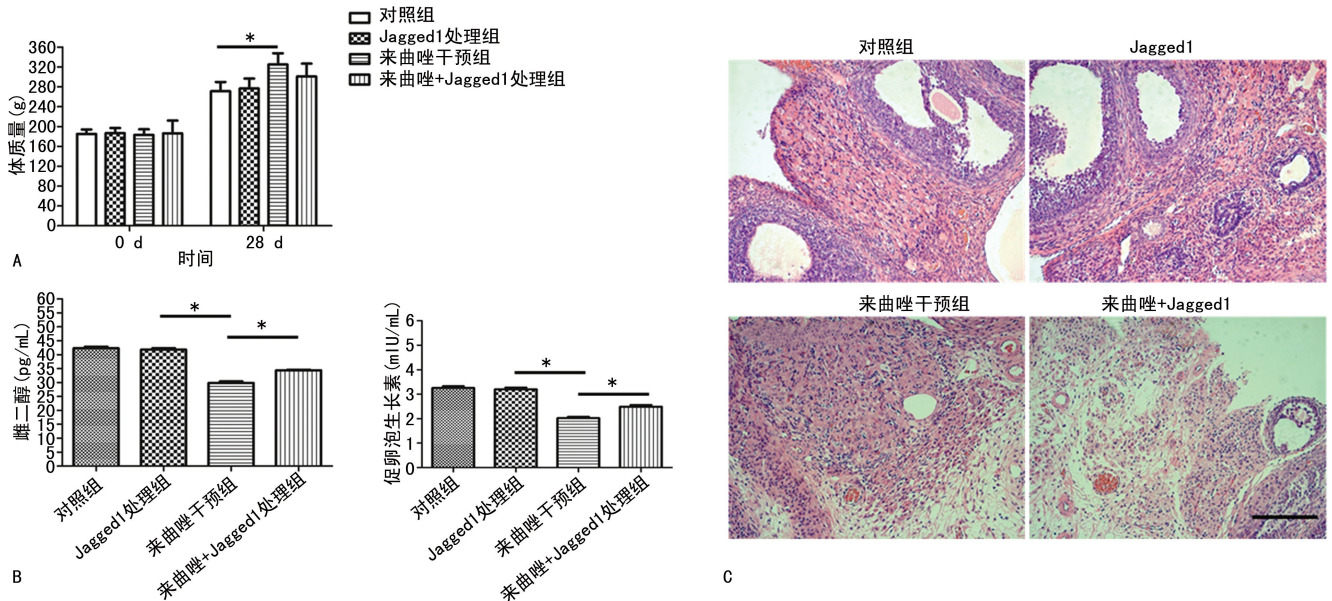
采用SPSS23.0统计学软件进行数据处理,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 $t$ 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 PCOS大鼠模型的建立

与对照组相比,PCOS模型组SD大鼠体质量显著升高( $P<0.05$ ),见图1A;PCOS组与对照组相比血清中E2、FSH水平显著降低( $P<0.05$ ),见图1B;对照组卵巢呈现大量黄体形态结构,存在不同发育阶段的卵泡:例如窦状卵泡、排卵前卵泡。卵泡颗粒细胞层排列紧密,形态结构正常。PCOS模型组卵巢则显现为病理性的改变,黄体结构较少,并且发现卵泡大量扩张,颗粒细胞层排列稀疏,没有放射冠及卵母细胞存在,存在卵巢间质细胞增生,卵巢呈典型多囊

样变性病变,见图 1C。

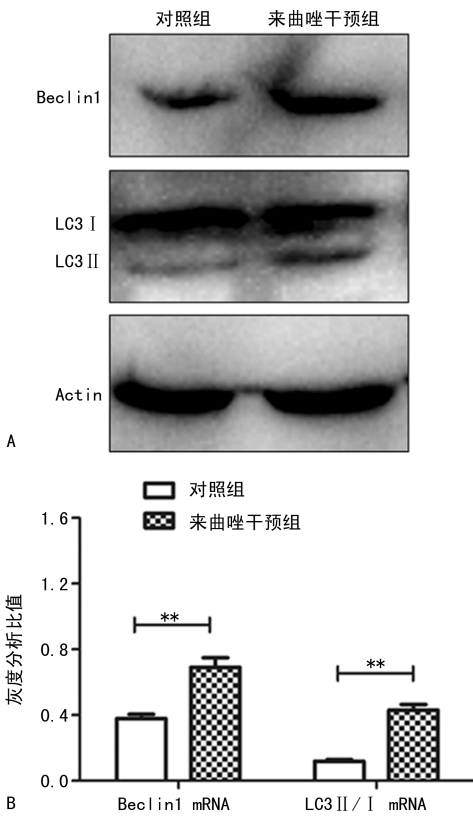


A: PCOS 建模过程中各组体质量的变化; B: 各组血清中雌二醇及促卵泡生长素的改变; C: HE 染色检测各组形态学改变; \* :  $P < 0.05$ 。

图 1 SD 大鼠模型的建立

### 2.2 PCOS 能够诱导自噬的发生

Western blot 检测显示 PCOS 模型组与对照组相比自噬相关蛋白 LC3 和 Beclin1 表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ ), 见图 2A。RT-PCR 检测显示 PCOS 模型组与对照组相比自噬相关蛋白 LC3 和 Beclin1 表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ ), 见图 2B。

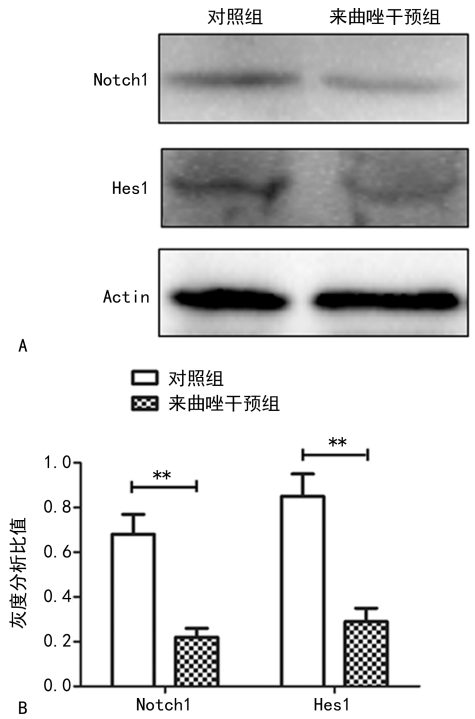


\*\* :  $P < 0.01$ 。

图 2 Western blot 检测来曲唑干预组与对照组自噬相关蛋白的表达

### 2.3 PCOS 能够抑制 Notch 信号通路的活化

Western blot 检测发现 PCOS 模型组与对照组相比, Notch1、Hes1 蛋白处于抑制状态, 见图 3。



\*\* :  $P < 0.01$ 。

图 3 Western blot 检测来曲唑处理后 Notch 信号通路相关分子的变化

### 2.4 激活 Notch 信号通路能够降低自噬的发生, 进而抑制 PCOS 的病理发生

Jagged1 干预能够引起 Notch 信号通路激活, 与来曲唑共同处理后发现, 来曲唑处理组的自噬相关蛋白表达降低, 自噬发生可能受到抑制, 同时, Jagged1

十白头翁皂苷 B4 处理组,细胞活力与单纯白头翁皂苷 B4 处理组增加,见图 4。

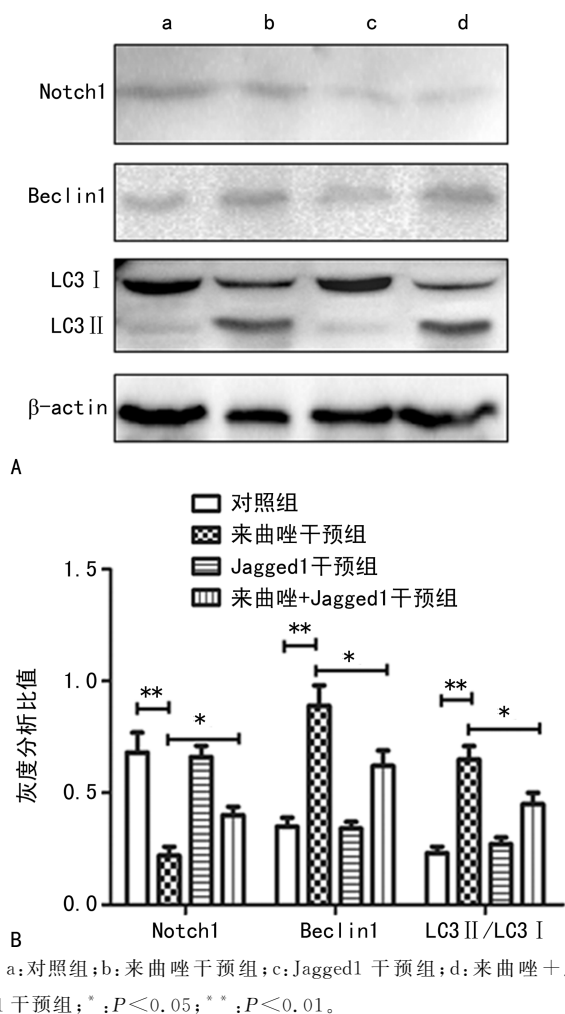


图 4 Western blot 检测自噬相关蛋白的表达

### 3 讨 论

PCOS 是当今影响育龄女性不孕不育的主要疾病,并对机体的内分泌存在一定的影响。其发病机制尚未阐明,本研究首先检测了 PCOS 模型建立的是否成功,运用目前对于 PCOS 模型检测的几个指标进行观察:血清中 E2、FSH 表达水平及卵巢组织的形态学观察<sup>[7]</sup>。发现 PCOS 模型组与对照组相比血清中 E2、FSH 水平显著降低,形态学检测也发现卵巢病理性的改变:黄体结构较少,并且发现卵泡大量扩张,颗粒细胞层排列稀疏,没有放射冠及卵母细胞存在,存在卵巢间质细胞增生,卵巢呈典型多囊样变性病变。诸多的结果表明本研究 PCOS 模型建立成功。自噬是细胞内的一种生理活动,在细胞各种应激过程中均会表达异常,有研究指出自噬与许多疾病的发生存在着紧密的联系<sup>[8]</sup>。为了进一步揭示 PCOS 的发病机制,本研究检测了 PCOS 卵巢组织中自噬水平的表达情况,Beclin1 和 LC3 分别是自噬发生过程中的关键蛋白分子,两种蛋白水平的改变可以代表细胞自噬的

水平<sup>[9]</sup>。Western blot 检测提示 PCOS 模型组自噬相关蛋白 LC3、Beclin1 表达水平增高。研究表明,自噬属于细胞的第二程序性死亡,参与细胞多项生理活动,且自噬的发生可能与 PCOS 关系密切<sup>[10-11]</sup>。本研究也发现 PCOS 模型组自噬水平上调,提示自噬的异常表现可能是导致 PCOS 的病理机制之一。调控自噬发生的信号通路较多,其中最为经典的为 mTOR/p70s6k 信号通路<sup>[12]</sup>。本研究为揭示 PCOS 模型中引起自噬水平升高的分子机制,运用 Western blot 检测了 mTOR/p70s6k 信号通路的活化状态,提示 PCOS 抑制了 mTOR/p70s6k 信号通路。PCOS 很可能是通过 mTOR/p70s6k 信号通路调节自噬发生的。Notch 信号通路与 mTOR 关系紧密,且参与细胞的免疫、应激、生长、分化及细胞增殖等各项生命活动<sup>[13-15]</sup>。本研究检测了 Notch 信号通路相关分子的变化情况,结果提示 PCOS 能够抑制 Notch 信号通路上的相关分子 Notch1, Hes1, Notch 信号通路可能参与了 PCOS 的病理发生过程。为了进一步验证 Notch 信号通路在 PCOS 发病过程中的分子机制和作用,运用 Notch 信号通路的一种激活剂 Jagged1 在 PCOS 建模过程中进行干预,观察 Notch 信号通路激活后自噬水平和 PCOS 病理进程的改变。结果发现经过 Notch 激动剂的干预,PCOS 模型建立的过程中病理进程有所缓解,血清中 E2、FSH 水平与模型组相比有所升高,提示 Notch 信号通路活化能够改善 PCOS 的发生。用 Western blot 检测了 Notch 信号通路活化后, mTOR/p70s6k 信号通路的改变,结果提示, mTOR/p70s6k 信号通路与模型组相比处于活化状态。本研究检测了自噬相关蛋白 Beclin1 和 LC3 的水平,经过 Notch 信号通路激活剂干预后,卵巢组织中自噬相关蛋白表达受到抑制。验证了 Notch 信号通路对自噬具有一定的调控作用,且激活 Notch 信号通路改善 PCOS 的发生很可能是通过调控自噬来完成的。

本研究证实了自噬的发生在 PCOS 发生中的重要作用,进一步揭示了 mTOR/p70s6k 信号通路及 Notch 信号通路的改变,阐明了 Notch 信号通路对自噬的调控作用在 PCOS 发生过程中的重要意义。为临床上 PCOS 的治疗和预防提供了重要的分子靶点和理论依据。

### 参考文献

[1] SANCHEZ-GARRIDO M A, TENA-SEMPERE M. Metabolic dysfunction in polycystic ovary syn-

- drome; pathogenic role of androgen excess and potential therapeutic strategies [J]. *Mol Metab*, 2020, 35:100937.
- [2] MOJAVERROSTAMI S, ASGHARI N, KHAMI-SABADI M, et al. The role of melatonin in polycystic ovary syndrome; a review[J]. *Int J Reprod Biomed*, 2019, 17(12):865-882.
- [3] SALEK M, CLARK C C T, TAGHIZADEH M, et al. N-3 fatty acids as preventive and therapeutic agents in attenuating PCOS complications[J]. *Excli J*, 2019, 18:558-575.
- [4] ZHANG J, CAO R, CAI T, et al. The role of autophagy dysregulation in manganese-induced dopaminergic neurodegeneration[J]. *Neur Res*, 2013, 24:478-490.
- [5] HABETS R A, DE BOCK C E, SERNEELS L, et al. Safe targeting of T cell acute lymphoblastic leukemia by pathology-specific NOTCH inhibition[J]. *Sci Transl Med*, 2019, 11(494):e6246.
- [6] MALIQUEO M, BENRICK A, STENER-VICTORIN E. Rodent models of polycystic ovary syndrome: phenotypic presentation, pathophysiology, and the effects of different interventions [J]. *Semin Reprod Med*, 2014, 32(3):183-193.
- [7] OMABE M, OMABE K N, CLEMENT F A, et al. Metabolic basis of polycystic ovarian syndrome; indications for biochemical screening [J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2016, 16(1):61-71.
- [8] GUO Z, YU Q. Role of mTOR signaling in female reproduction[J]. *Front Endocrinol*, 2019, 10:692.
- [9] MONACO A, FRALDI A. Protein aggregation and dysfunction of autophagy-lysosomal pathway: a vicious cycle in lysosomal storage diseases[J]. *Front Mol Neurosci*, 2020, 13:37.
- [10] LAJTAI K, NAGY C T, TARSZABÓ R, et al. Effects of vitamin d deficiency on proliferation and autophagy of ovarian and liver tissues in a rat model of polycystic ovary syndrome[J]. *Biomolecules*, 2019, 9(9):471.
- [11] LI X, QI J, ZHU Q, et al. The role of androgen in autophagy of granulosa cells from PCOS[J]. *Gynecol Endocrinol*, 2019, 35(8):669-672.
- [12] KONG W, MAO J, YANG Y, et al. Mechanisms of mTOR and autophagy in human endothelial cell infected with dengue virus-2[J]. *Viral Immunol*, 2020, 33(1):61-70.
- [13] GUO L, YU H, GU W, et al. Autophagy negatively regulates transmissible gastroenteritis virus replication[J]. *Sci Report*, 2016, 6:23864.
- [14] ROMERO M, ZORZANO A. Role of autophagy in the regulation of adipose tissue biology [J]. *Cell Cycle*, 2019, 3:1-11.
- [15] RUSSELL K L, GORGULHO C M, ALLEN A, et al. Inhibiting autophagy in renal cell cancer and the associated tumor endothelium [J]. *Cancer J*, 2019, 25(3):165-177.

(收稿日期:2020-01-18 修回日期:2020-09-02)