

基于 NLRP3 通路探讨线粒体自噬在 PCOS 卵巢组织炎症反应中的作用

李 杨, 聂 岚, 罗 婷, 刘虹璐, 罗 姣

(湖南省妇幼保健院不孕不育与内分泌专科, 长沙 410000)

摘要 目的 基于 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NLRP3) 通路探讨线粒体自噬在多囊卵巢综合征 (PCOS) 卵巢组织炎症反应中的作用。方法 人卵巢颗粒细胞 (GCs) 系 SVOG 用 25 nmol/L 双氢睾酮 (DHT) 处理 24 h 以建立 PCOS 细胞模型。SVOG 细胞用携带 NLRP3 (Ad-NLRP3) 及阴性载体 (Ad-EV) 或 NLRP3 shRNA (sh-NLRP3) 及阴性对照 (sh-NC) 的腺病毒转染, 以过表达或敲低 NLRP3 表达。使用 Mito-Tracker 染色和 GFP-LC3 染色评估细胞中线粒体自噬情况。分别通过 TUNEL 染色、JC-1 染色、Mito-SOX 染色分析细胞凋亡、线粒体膜电位、线粒体衍生超氧化物产生情况。32 只雌性 BALB/c 小鼠随机分为: 对照 (Con) 组、脱氢表雄酮 (DHEA) 组、DHEA + sh-NC 组、DHEA + sh-NLRP3 组, 每组 8 只。除 Con 组外, 其他组用 DHEA 处理小鼠以建立 PCOS 模型。DHEA + sh-NLRP3 组、DHEA + sh-NC 组通过尾静脉注射浓度为 1×10^9 TU/ml 的慢病毒包装的 sh-NLRP3 或 sh-NC。透射电子显微镜观察各组小鼠卵巢组织中线粒体的超微结构。结果 与 DHT + sh-NC 组相比, DHT + sh-NLRP3 组 SVOG 细胞的 NLRP3 水平降低 ($P < 0.05$)。DHT + sh-NLRP3 组 SVOG 细胞中 GFP-LC3 和线粒体的共定位较 DHT + sh-NC 组增加 ($P < 0.05$)。与 DHT + sh-NC 组相比, DHT + sh-NLRP3 组 SVOG 细胞的 TUNEL 阳性细胞的数目和 Mito-SOX 荧光密度降低、多聚体 JC-1/单体 JC-1 比值增加 ($P < 0.05$)。与 Con + Ad-EV 组相比, Con + Ad-NLRP3 组 SVOG 细胞的 NLRP3 水平、TUNEL 阳性细胞数目、Mito-SOX 荧光密度增加 ($P < 0.05$), GFP-LC3 和线粒体的共定位以及多聚体 JC-1/单体 JC-1 比值降低 ($P < 0.05$)。与 Con 组相比, DHEA 组小鼠卵巢组织中 TUNEL 阳性细胞、相对活性氧 (ROS) 强度和受损线粒体百分比均显著增加 ($P < 0.05$)。与 DHEA + sh-NC 组相比, DHEA + sh-NLRP3 组卵巢组织中 TUNEL 阳性细胞、相对 ROS 强度和受损线粒体百分比均降低 ($P < 0.05$)。结论 NLRP3 激活诱导的线粒体自噬活性导致线粒体功能障碍并促进 GCs 中线粒体相关凋亡。NLRP3 敲低有利于线粒体稳态, 并改善 GCs 对氧化应激损伤的抵抗, 从而促进 PCOS 的恢复。

关键词 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3; 线粒体自噬; 多囊卵巢综合征; 氧化应激; 线粒体稳态; 颗粒细胞; 小鼠

中图分类号 R 711.75

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)09-1573-10

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.09.012

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 是最常见的内分泌疾病, 影响全球 6% ~ 9% 的 28 ~ 45 岁女性, 其发病机制尚未阐明^[1-2]。颗粒细胞 (granulosa cells, GCs) 是卵巢功能单位的主要组分, 其凋亡与卵母细胞质量差、卵巢功能障碍和低受精率相关^[3]。研究^[4]表明, 过量的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 可以诱导和激活 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3) 炎症体的释放, 这是导致 GCs 死亡的主要原因。线粒体是细胞内 ROS 产生的主要场所。线粒体功能障碍可能是 PCOS 发病过程中的一个促进因素, 尤其是

GCs 凋亡^[5]。线粒体自噬是选择性去除受损或过量线粒体的过程, 在维持线粒体的正常功能方面发挥着重要作用^[6-7]。研究表明, 线粒体自噬在受损组织中发挥保护作用, 如卵巢^[8]。此外, 线粒体自噬可以消除线粒体 ROS, 从而抑制 NLRP3 炎症小体的激活来保护细胞免受炎症损伤^[9]。该研究基于 NLRP3 通路探讨线粒体自噬在 PCOS 小鼠卵巢 GCs 线粒体功能障碍中的作用, 旨在为改善 GCs 功能和减轻卵巢氧化应激提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞培养和处理 永生的人卵巢 GCs 系 SVOG (加拿大 ABM 公司) 在含有 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的 Dulbecco 氏改良 Eagle 培养基中培养。之后, 将 SVOG 细胞以 2×10^5 细胞/孔的密度接种到 6 孔板中, 并进行 4 h 血清饥饿, 然后用 25 nmol/L 双氢睾酮 (dihydrotes-

2024-08-19 接收

基金项目: 湖南省自然科学基金 (编号: S2023JJBMLH1343)

作者简介: 李 杨, 女, 本科, 副主任医师;

聂 岚, 女, 主任医师, 通信作者, E-mail: 1557073946@qq.com

com

tosterone, DHT) 处理 24 h 以建立 PCOS 细胞模型^[10]。为了考察 NLRP3 在 DHT 诱导的 PCOS 细胞模型中表达情况,用不同浓度(0、5、10、25 nmol/L) DHT 处理细胞 24 h。为了考察 NLRP3 对线粒体自噬活性的影响,将细胞分为 Con + sh-NC、Con + sh-NLRP3、DHT + sh-NC 和 DHT + sh-NLRP3 不同处理组。各组在用 25 nmol/L DHT 处理细胞前 24 h,分别用携带 sh-NC 或 sh-NLRP3 的腺病毒转染细胞。为了考察 NLRP3 过表达模拟 DHT 诱导的线粒体自噬抑制,将细胞分为 Con + Ad-EV、Con + Ad-NLRP3、DHT + Ad-EV、DHT + Ad-NLRP3 不同处理组。各组在用 25 nmol/L DHT 处理细胞前 24 h,分别用携带 Ad-EV 或 Ad-NLRP3 的腺病毒转染细胞。

1.2 腺病毒转染 SVOG 细胞用携带 NLRP3 (Ad-NLRP3) 或 NLRP3 shRNA (sh-NLRP3) 的腺病毒转染。腺病毒由广州 GeneCopoeia 公司合成。将 SVOG 细胞装载在 24 孔板(1 × 10⁵ 细胞/孔)中,并使用 Lipofectamine 2000 (美国 Invitrogen 公司)转染上述腺病毒。转染 24 h 后,用普通培养基处理细胞 24 h。

1.3 CCK-8 法测定细胞活力 细胞处理 24 h 后,向每个孔中加入 20 μL CCK-8 工作试剂(美国 Abbkine 公司)并在 37 °C 下孵育 1 h。用 96 孔板读数器(美国 Bio-Rad 公司)在 450 nm 处记录吸光度值。

1.4 细胞中线粒体自噬的评估 用 MitoTracker 红色 CMXRos 探针(美国 Thermo Fisher 公司)标记线粒体。用携带绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)-LC3 的腺病毒转染 SVOG 细胞以标记 LC3。通过 GFP-LC3 与线粒体共定位来检测线粒体自噬。使用 A1R 激光共聚焦显微镜(日本 Nikon 公司)获得荧光图像。

1.5 ROS 测量 通过使用 DHE 探针(北京 Solarbio 公司)测定卵巢 ROS 水平。通过使用 DCFH-DA 探针(上海 Beyotime 公司)测量细胞内 ROS 的水平。使用 MitoSOX 红色线粒体超氧化物指示剂(美国 Invitrogen 公司)来定量线粒体 ROS 产生。使用 A1R 激光共聚焦显微镜捕捉图像。

1.6 线粒体膜电位测定 将 GCs 细胞接种在具有透明底部的 20 mm 培养皿中。使用 JC-1 线粒体膜电位测定试剂盒(英国 Abcam 公司)进行 JC-1 染色,计算红色(JC-1 多聚体)荧光与绿色(JC-1 单体)荧光的比率用于反应线粒体膜电位。

1.7 动物及分组处理 45 只雌性 BALB/c 小鼠(3 周,10 ~ 12 g)购自南京君科生物工程有限公司[动

物许可证号:SCXK(苏)2019-0004]。将小鼠饲养在 SPF 环境中,室温 24 °C 和 12 h 的光/暗循环。提供了足够的食物和水。根据文献描述的方法,用脱氢表雄酮(dehydroepiandrosterone, DHEA)处理小鼠以建立 PCOS 小鼠模型^[11]。实验小鼠每天皮下注射 60 mg/kg DHEA(100 μL/小鼠,120 mg DHEA 溶于 4 ml 含有 10% 95% 乙醇的芝麻油中),持续 20 d,对照组小鼠每天注射 0.09 ml 芝麻油和 0.01 ml 95% 乙醇,持续 20 d。从注射 DHEA 的第 10 天开始每天监测发情期,直到实验结束。20 d 后,测量禁食 12 h 的小鼠的空腹血糖和空腹胰岛素水平,并计算胰岛素抵抗指数。HOMA 胰岛素抵抗的评估公式为:空腹胰岛素浓度(单位:μU/ml) × 空腹血糖浓度(单位:mmol/L)/22.5。HOMA-IR > 2.8 的 PCOS 小鼠初步认为是成功的 PCOS 小鼠模型^[11]。在 45 只小鼠中,随机选择 37 只小鼠用于建模,剩余的 8 只小鼠用作对照组(Con 组)。有 30 只小鼠达到 HOMA-IR > 2.8,其中 6 只小鼠安乐死用于苏木精和伊红(H&E)染色以鉴定建模成功(存在更大的囊性滤泡、更薄的颗粒层和滤泡膜细胞层以及减少的黄体细胞),其余 24 只小鼠分成 3 组(DHEA 组、DHEA + sh-NC 组、DHEA + sh-NLRP3 组)。通过戊巴比妥钠(50 mg/kg, i. p.)麻醉小鼠,DHEA + sh-NLRP3 组、DHEA + sh-NC 组同时通过尾静脉注射浓度为 1 × 10⁹ TU/ml 的慢病毒包装的 sh-NLRP3 或 sh-NC,在相同条件下饲养注射和不注射慢病毒的小鼠。两周后,通过腹腔内注射 150 mg/kg 戊巴比妥钠对所有小鼠实施安乐死,并收集卵巢和血清样品。其中,每组 6 个卵巢样本用于组织学检查,每组另外 6 个卵巢样本用于蛋白质印迹分析,血清样本用于 ELISA。

1.8 性激素[雌二醇、孕酮、黄体生成素(luteinising hormone, LH)、卵泡刺激素(follicle stimulating hormone, FSH)]测量 收集血样,立即分离血清并储存在 -80 °C,以通过酶联免疫吸附试验(ELISA)(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司)进一步测定雌二醇、孕酮、LH、FSH 水平。

1.9 HE 染色 从小鼠分离卵巢组织,常规包埋在石蜡中,切成 6 μm 冠状切片,并用苏木精和伊红(美国 Sigma 公司)染色。在显微镜(日本 Nikon 公司)下观察卵巢组织的形态学变化。

1.10 透射电子显微镜 将卵巢样本修剪成小块(1 mm³)用 2% 戊二醛、1% 四氧化锇固定。切成 70 nm 厚的切片并用柠檬酸铅染色,用 H-7650 透射电

子显微镜(日本日立公司)检测各组小鼠卵巢组织中线粒体的超微结构。

1.11 蛋白质印迹分析 通过在 RIPA 裂解缓冲液(上海 Beyotime 公司)提取卵巢和 GCs 中蛋白。通过 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离等量的总蛋白质,然后将蛋白质条带转移到聚偏二氟乙烯膜(英国 Amersham 公司)上。目标条带与针对 NLRP3 (1 : 1 000, 美国 AdipoGen Life Science 公司)、PTEN 诱导激酶 1 (PTEN-induced kinase 1, PINK1) (1 : 1 000, 英国 Abcam 公司)、(Parkin RBR E3 ubiquitin-protein ligase, Parkin) (1 : 1 000, 美国 Abnova 公司)、微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein1 light chain 3, LC3) (1 : 1 000, 美国 CST 公司)、螯合体 1 (SQSTM1, P62) (1 : 1 000, Abcam) 和甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) (1 : 4 000, 上海 Beyotime Biotechnology 公司)在 4 °C 下孵育过夜,然后加入 HRP 标记的二抗。使用化学发光检测(德国 Merck Millipore 公司)使印迹可视化。GAPDH 蛋白用作上样对照。

1.12 TUNEL 凋亡分析 使用 TUNEL 凋亡检测试剂盒(美国 Abbkine 公司)评估小鼠卵巢和细胞中的凋亡情况。卵巢切片和细胞用 4% 多聚甲醛固定,然后在黑暗用 TUNEL 检测溶液染色 1 h。使用 A1R 激光共聚焦显微镜(日本 Nikon 公司)捕捉荧光图像。

1.13 统计学处理 所有统计分析均采用 SPSS 22.0 软件进行。数据表示为平均值 ± 标准差。单因素方差分析(ANOVA)和 Turkey 事后检验用于多组之间的比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NLRP3 在 DHT 诱导的 PCOS 细胞模型中高

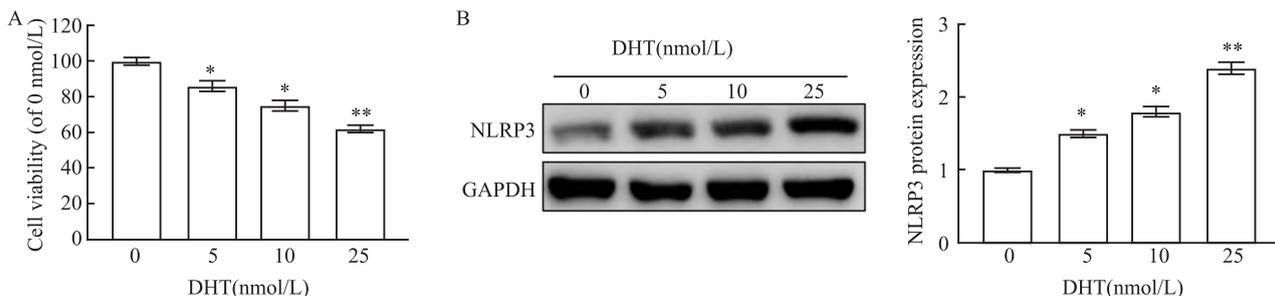


图1 NLRP3 在 DHT (0 ~ 25 nmol/L) 处理 24 h 的 PCOS 细胞模型中高表达情况

Fig. 1 NLRP3 highly expressed in PCOS cells treated with DHT (0 ~ 25 nmol/L) for 24 h

A: CCK-8 assay was used to determine the viability of SVOG cells; B: Western blot was used to determine the expression of NLRP3 in SVOG cells;

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 nmol/L DHT group.

表达 采用不同浓度 DHT 刺激 GCs 系 SVOG, 结果显示, DHT 以浓度依赖方式诱导 SVOG 细胞活力降低 ($F = 7.24, P < 0.001$), 并且细胞中 NLRP3 蛋白表达以浓度依赖方式增加 ($F = 8.62, P < 0.001$) (图 1)。

2.2 经 DHT 处理后的 SVOG 细胞中 NLRP3 对线粒体自噬活性的影响 与 Con + sh-NC 组相比, DHT + sh-NC 组 SVOG 细胞的 NLRP3 水平增加 ($P < 0.05$), PINK1、Parkin、LC3 I/LC3 II 蛋白表达降低 ($P < 0.05$), P62 蛋白表达增加 ($P < 0.05$); 结果表明线粒体自噬活性显著降低。与 DHT + sh-NC 组相比, DHT + sh-NLRP3 组 SVOG 细胞的 NLRP3 水平降低 ($P < 0.05$), PINK1、Parkin、LC3 I/LC3 II 蛋白表达增加 ($P < 0.05$), P62 蛋白表达降低 ($P < 0.05$); 结果表明敲除 DHT 处理的 SVOG 细胞中的 NLRP3 恢复了线粒体自噬活性(图 2A、表 1)。如图 2B 所示, 与 Con + sh-NC 组比较, DHT + sh-NC 组 SVOG 细胞中 GFP-LC3 和线粒体的共定位数降低 ($P < 0.05$), 表明线粒体自噬活性受到抑制。DHT + sh-NLRP3 组 SVOG 细胞中 GFP-LC3 和线粒体的共定位数较 DHT + sh-NC 组显著增加 ($P < 0.05$), 表明 NLRP3 基因敲除预防 DHT 诱导 SVOG 细胞的线粒体自噬活性抑制。

2.3 NLRP3 敲除对 DHT 诱导的线粒体衍生的氧化应激和线粒体依赖性凋亡影响 与 Con + sh-NC 组相比, DHT + sh-NC 组 TUNEL 阳性细胞的数目和 Mito-SOX 荧光密度显著增加 ($P < 0.05$), 多聚体 JC-1/单体 JC-1 比值显著降低 ($P < 0.05$); 结果表明 DHT 诱导的凋亡是线粒体依赖性。与 DHT + sh-NC 组相比, DHT + sh-NLRP3 组 SVOG 细胞的 TUNEL 阳性细胞的数目和 Mito-SOX 荧光密度显著降低 ($P < 0.05$), 多聚体 JC-1/单体 JC-1 比值增加 ($P < 0.05$); 结果表明 NLRP3 的敲除通过升高线粒体膜

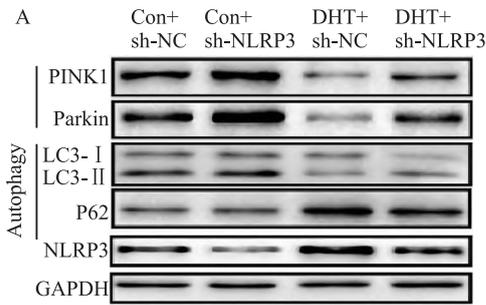


图2 在 DHT 处理的 SVOG 细胞中测定 NLRP3 对线粒体自噬活性的影响

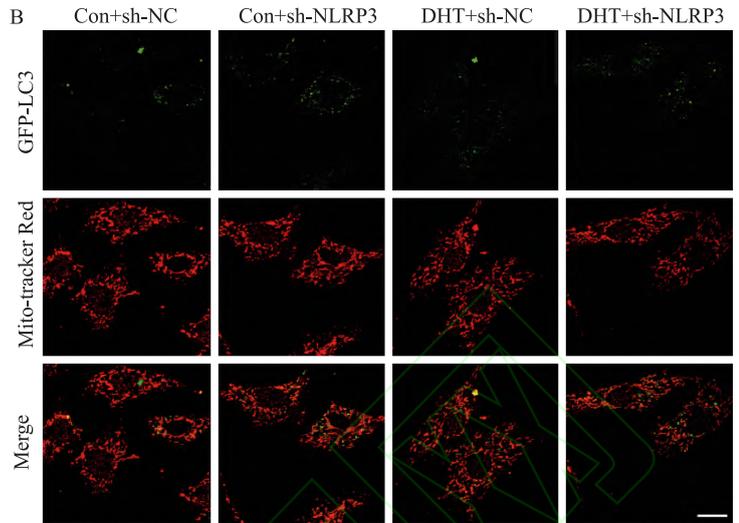


Fig. 1 The effect of NLRP3 on mitophagy activity was determined in DHT-treated SVOG cells

A: The gel blot images of Western blot analysis of NLRP3 protein, autophagy protein (LC3II/I, P62) and mitophagy protein (PINK1, Parkin) in SVOG cells ($n=3$, scale bar = 50 μm); B: Confocal microscopy images of SVOG cells stained with Mito-Tracker staining (red) and GFP-LC3 (green)

表1 DHT 处理的 SVOG 细胞中 NLRP3 对线粒体自噬活性的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Effect of NLRP3 on mitophagy activity in DHT-treated SVOG cells ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Group	PINK1	Parkin	LC3 I /LC3 II	P62	NLRP3	Points of each cell colocalized LC3
Con + sh-NC	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.02	10.54 ± 1.22
Con + sh-NLRP3	1.33 ± 0.04*	1.22 ± 0.03	1.17 ± 0.04	1.17 ± 0.02	0.31 ± 0.03***	12.08 ± 1.05
DHT + sh-NC	0.47 ± 0.05*	0.33 ± 0.04**	0.71 ± 0.02*	2.05 ± 0.10**	1.78 ± 0.08**	5.13 ± 0.89**
DHT + sh-NLRP3	0.77 ± 0.04#	0.74 ± 0.05##	0.92 ± 0.03#	1.32 ± 0.03#	1.08 ± 0.06##	9.27 ± 1.05##
F value	8.15	10.82	5.54	7.86	15.04	10.46
P value	<0.001	<0.001	0.006	<0.001	<0.001	<0.001

** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ vs Con + sh-NC group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs DHT + sh-NC group.

电位和减少线粒体产生 ROS 显著抑制了线粒体依赖性细胞凋亡。见图 3。

2.4 NLRP3 过表达加剧 DHT 诱导的线粒体自噬抑制 为了进一步揭示上调的 NLRP3 对线粒体自噬和相关 SVOG 损伤的作用,使用与 NLRP3 重组的腺病毒(Ad-NLRP3)诱导 NLRP3 在 SVOG 细胞中过表达。与 Con + Ad-EV 组相比,Con + Ad-NLRP3 组

SVOG 细胞的 NLRP3 水平、TUNEL 阳性细胞数目、Mito-SOX 荧光密度增加 ($P < 0.05$), PINK1、Parkin、LC3 I /LC3 II 蛋白表达降低 ($P < 0.05$), GFP-LC3 和线粒体的共定位以及多聚体 JC-1/单体 JC-1 比值降低 ($P < 0.05$);结果表明 NLRP3 过表达在正常处理的 SVOG 细胞中显著抑制线粒体自噬和阻断自噬流,并诱导线粒体依赖性细胞凋亡(图4、表2)。

表2 NLRP3 过表达模拟 DHT 诱导的线粒体自噬抑制对 SVOG 细胞线粒体衍生的氧化应激和凋亡影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Overexpression of NLRP3 simulates DHT induced mitochondrial autophagy inhibition and its effects on mitochondrial derived oxidative stress and apoptosis in SVOG cells ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Group	PINK1	Parkin	LC3 I /LC3 II	P62	NLRP3	Points of each cell colocalized LC3	TUNEL-positive cells (%)	Red/green fluorescence (% Con + Ad-EV)	Mito-SOX fluorescence density (the multiple of Con + Ad-EV)
Con + Ad-EV	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.02	11.73 ± 1.15	6.83 ± 0.92	100.00 ± 2.74	1.00 ± 0.04
Con + Ad-NLRP3	0.48 ± 0.05*	0.60 ± 0.06*	0.58 ± 0.05*	1.33 ± 0.05*	1.81 ± 0.10**	6.22 ± 0.93*	15.76 ± 1.33*	56.72 ± 3.37*	2.75 ± 0.11*
DHT + Ad-EV	0.57 ± 0.05*	0.64 ± 0.05*	0.51 ± 0.04*	1.56 ± 0.07*	1.75 ± 0.08**	5.26 ± 0.84*	32.34 ± 2.02**	47.84 ± 1.05**	4.82 ± 0.37**
DHT + Ad-NLRP3	0.28 ± 0.02#	0.36 ± 0.04#	0.42 ± 0.03	1.95 ± 0.08#	2.67 ± 0.22#	4.51 ± 0.79	41.85 ± 2.37#	40.62 ± 1.18	5.31 ± 0.33
F value	13.26	12.14	5.94	8.36	12.31	5.62	24.31	9.41	18.72
P value	<0.001	<0.001	0.005	<0.001	<0.001	0.007	<0.001	<0.001	<0.001

** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$, **** $P < 0.001$ vs Con + Ad-EV group; # $P < 0.05$ vs DHT + Ad-EV group

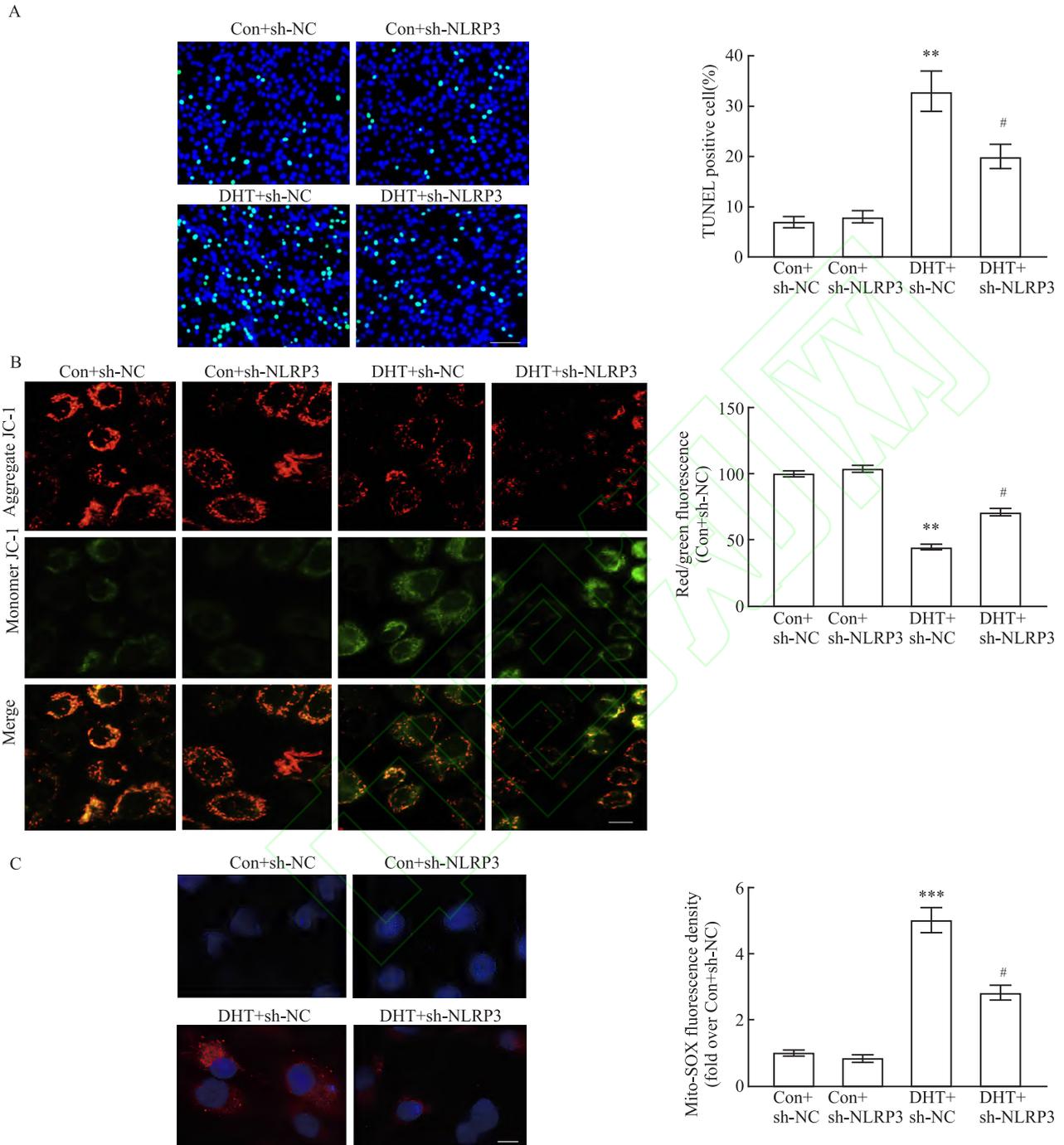


图3 NLRP3 敲除抑制 DHT 诱导的线粒体衍生的氧化应激和线粒体依赖性凋亡

Fig.3 NLRP3 knockout inhibited DHT-induced mitochondrial-derived oxidative stress and mitochondrial-dependent apoptosis

A: TUNEL staining of apoptotic cells ($n=3$, scale bar = 200 μm); green fluorescence: TUNEL staining; blue fluorescence: nucleus; B: Representative confocal microscopy images of JC-1 staining ($n=3$, scale bar = 50 μm); red fluorescence: JC-1 polymer; green fluorescence: JC-1 monomer; C: Mito-SOX staining for analysis of mitochondrial-derived superoxide production ($n=3$, scale bar = 50 μm); ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Con + sh-NC group; # $P < 0.05$ vs DHT + sh-NC group.

此外,与 DHT + Ad-EV 组相比,DHT + Ad-NLRP3 组 SVOG 细胞的 NLRP3 水平、TUNEL 阳性细胞数目增加 ($P < 0.05$), PINK1、Parkin 蛋白表达降低 ($P < 0.05$);结果表明 NLRP3 过表达加剧 DHT 诱导的线

粒体自噬活性抑制和细胞凋亡。

2.5 NLRP3 敲低对 PCOS 表型和氧化应激损伤影响 为了探索 NLRP3 在 PCOS 的功能,建立了 DHEA 诱导的 PCOS 小鼠模型。与对照组相比,

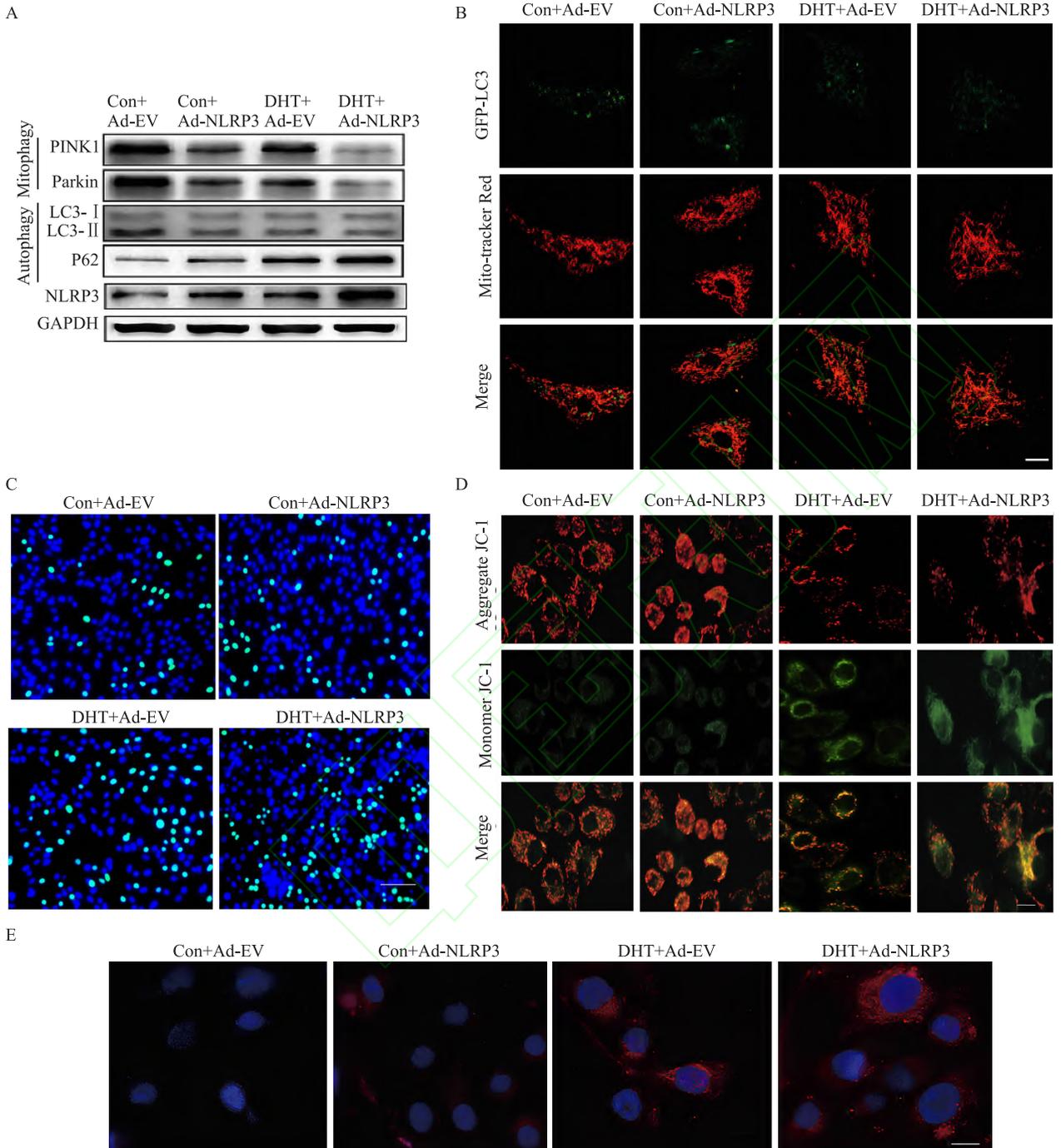


图 4 NLRP3 过表达对 DHT 诱导的线粒体自噬抑制影响

Fig. 4 Effect of NLRP3 overexpression on DHT-induced inhibition of mitophagy

A: Gel imprinting image of Western blot analysis of NLRP3 protein, autophagy protein (LC3II/I, P62) and mitophagy protein (PINK1, Parkin) in SVOG cells ($n = 3$, scale bar = 20 μm); B: Confocal microscopy images of SVOG cells stained with Mito-Tracker staining and GFP-LC3; C: TUNEL staining analysis of apoptosis cells ($n = 3$, scale bar = 200 μm); D: Representative confocal microscopy images of JC-1 staining ($n = 3$, scale bar = 50 μm); red fluorescence: JC-1 polymer; green fluorescence: JC-1 monomer; E: Mito-SOX staining analyzed mitochondrial-derived superoxide production ($n = 3$, scale bar = 50 μm).

DHEA 组血清雌二醇、孕酮、LH 和 FSH 的水平增加 ($P < 0.05$)。与 DHEA + sh-NC 组相比, DHEA + sh-NLRP3 组卵巢组织中 NLRP3 蛋白表达降低 ($P < 0.05$), 并且血清雌二醇、孕酮、LH 和 FSH 的水平降

低 ($P < 0.05$) (表 3、4 和图 5A)。通过 HE 染色, 观察到正常小鼠呈现完整的卵巢结构、不同阶段的多个黄体细胞和卵泡, 而 DHEA 组和 DHEA + sh-NC 组小鼠呈现较大的囊性卵泡、较薄的颗粒层和卵泡

膜细胞层以及减少的黄体细胞。相比之下, DHEA + sh-NLRP3 组卵巢的组织形态学特征得到改善,但仍存在大量闭锁卵泡和卵泡囊肿(图 5B)。此外,与对照组相比, DHEA 组小鼠卵巢组织中 TUNEL 阳性细胞、相对 ROS 强度和受损线粒体百分比均增加(P

<0.05)。与 DHEA + sh-NC 组相比, DHEA + sh-NLRP3 组卵巢组织中 TUNEL 阳性细胞、相对 ROS 强度和受损线粒体百分比均降低($P < 0.05$),表明 NLRP3 敲低缓解 PCOS 氧化应激损伤(表 4 和图 5C、D)。

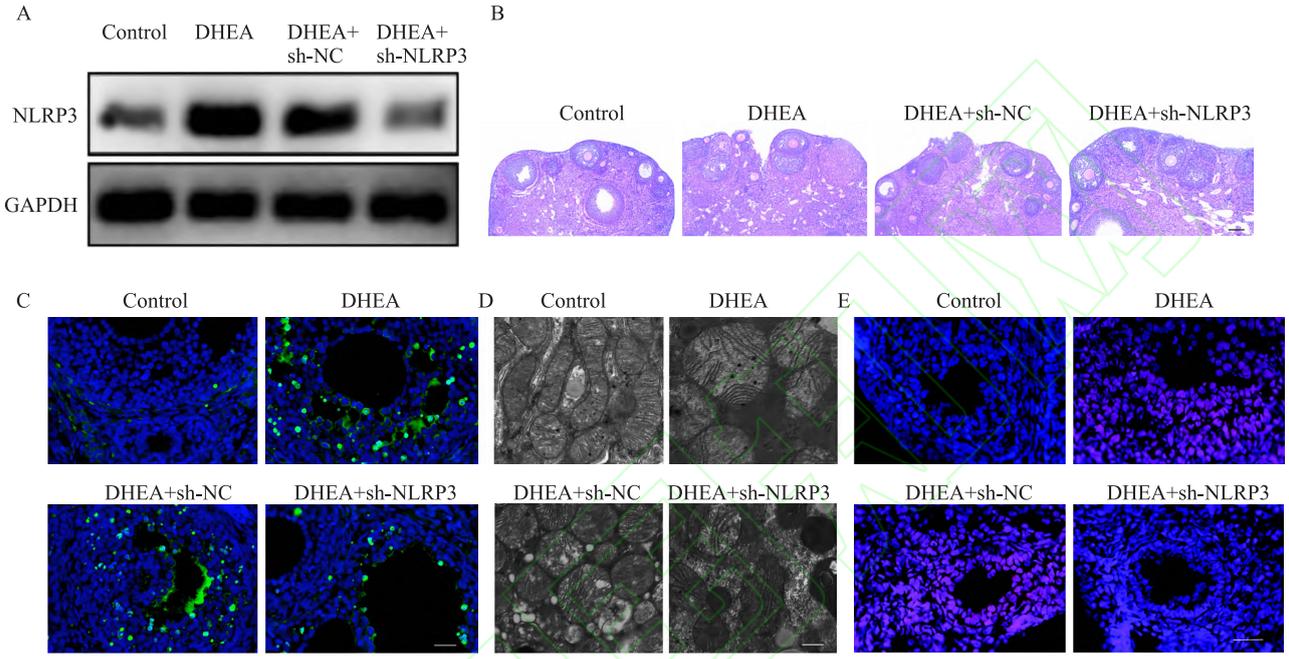


图 5 NLRP3 敲低减轻小鼠卵巢氧化应激损伤 ($n=8$)

Fig. 5 Knockdown of NLRP3 alleviates oxidative stress damage in mouse ovaries ($n=8$)

A: Western blot was used to detect the expression of NLRP3 protein in ovarian tissue; B: HE staining showed the ovarian structure in each group of mice (scale bar = 200 μm); C: TUNEL staining was used to detect apoptotic cells in ovarian tissues of mice in each group (scale bar = 100 μm); D: The ultrastructure of mitochondria in ovarian tissue of mice in each group was observed by transmission electron microscope (scale bar = 2 μm); E: MitSOX staining was used to detect the production of superoxide in ovarian tissues of mice in each group (scale bar = 100 μm).

表 3 各组血清激素水平 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Serum hormone levels in each group ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Group	HOMA-IR	Estradiol (pg/ml)	Progesterone (ng/ml)	LH (IU/L)	FSH (IU/L)
Control	2.42 \pm 0.35	24.92 \pm 1.30	1.62 \pm 0.14	6.30 \pm 0.52	2.40 \pm 0.20
DHEA	8.15 \pm 0.85 **	76.02 \pm 4.71 **	4.77 \pm 0.53 *	18.84 \pm 1.23 **	5.40 \pm 0.20 *
DHEA + sh-NC	8.30 \pm 1.06 **	80.25 \pm 5.86 **	5.10 \pm 0.43 *	18.11 \pm 1.15 **	5.10 \pm 0.20 *
DHEA + sh-NLRP3	5.42 \pm 0.81 #	42.35 \pm 1.55 #	2.13 \pm 0.15 #	8.83 \pm 0.62 #	3.80 \pm 0.10 #
F value	8.72	14.16	15.73	10.85	9.26
P value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Con + Ad-EV group; # $P < 0.05$ vs DHT + Ad-EV group.

表 4 NLRP3 敲低缓解氧化应激损伤 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

Table 4 NLRP3 knockdown alleviates oxidative stress injury ($n=8, \bar{x} \pm s$)

Group	NLRP3	TUNEL positive cells (%)	Relative ROS intensity	Percentage of damaged mitochondria (%)
Control	1.00 \pm 0.04	5.73 \pm 0.94	0.32 \pm 0.04	2.42 \pm 0.18
DHEA	3.12 \pm 0.31 ***	21.54 \pm 2.88 **	1.25 \pm 0.15 ***	35.73 \pm 3.78 ***
DHEA + sh-NC	2.85 \pm 0.27 ***	23.05 \pm 3.01 **	1.30 \pm 0.17 ***	34.16 \pm 3.84 ***
DHEA + sh-NLRP3	0.72 \pm 0.06 ###	11.76 \pm 1.62 #	0.71 \pm 0.08 ##	15.60 \pm 2.72 ##
F value	22.48	23.56	33.52	30.82
P value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Con + Ad-EV group; # $P < 0.05$ vs DHT + Ad-EV group.

3 讨论

GCs 构成了最大的卵泡细胞群,它们的代谢和凋亡与卵巢功能障碍密切相关^[8]。氧化应激是细胞凋亡的主要原因之一,由 ROS 过量产生和抗氧化机制受损引起。因此,保护 GCs 免受氧化应激损伤对于治疗 PCOS 具有重要意义^[12]。本研究确定了 NLRP3 在 DHT 诱导的 GCs 氧化应激模型和 DHEA 诱导的 PCOS 小鼠卵巢中增加。NLRP3 的过度表达加重了细胞功能障碍,从而加剧了小鼠卵巢氧化应激损伤。潜在的机制可能涉及在氧化应激条件下抑制了 GCs 中的线粒体自噬并诱导了线粒体相关的凋亡。此外,敲低 NLRP3 减轻了氧化应激诱导的 GCs 功能障碍。

GCs 的凋亡是一种炎症引发的程序性细胞死亡,其特征在在于可在 GCs 中检测到 NLRP3 的激活^[4]。GCs 凋亡可由高雄激素血症导致的 NLRP3 激活触发,这进一步与 PCOS 的炎症反应和高胰岛素血症相关^[13]。NLRP3 是一种多能分子,先前研究^[14]揭示了 NLRP3 下调在妇科疾病中的广泛作用。NLRP3 增加导致不孕和卵母细胞及卵泡发育停滞,其敲除抑制了子宫内膜异位症的进展。研究^[15]表明,NLRP3 上调与 GCs 凋亡和卵母细胞功能障碍之间存在关联。本研究中,过度表达 NLRP3 通过破坏线粒体功能和增加氧化应激条件下的凋亡来损害 GCs 功能,这与先前的研究^[4]相互验证。氧化应激暴露后,NLRP3 敲除促进 GCs 增殖并降低细胞间 ROS 含量。此外,与以前的文献^[14]一致,该研究结果证明了 NLRP3 在 PCOS 小鼠卵巢组织中的上调,并且 NLRP3 敲低修复卵巢损伤,降低抗卵泡发育激素水平。这些结果表明,GCs 凋亡的潜在机制可能归因于 NLRP3 在调节线粒体功能和线粒体相关的凋亡途径中的作用。

线粒体是 GCs 的重要细胞器。持续的线粒体功能障碍可导致氧化应激诱导的 GCs 损伤,进而导致凋亡增加、增殖减少、生物功能受损和卵泡发育异常,甚至卵巢功能紊乱^[16]。自噬对于维持细胞稳态和生存之间的平衡至关重要。在生理条件下,自噬具有多种功能,包括平衡排卵和卵泡闭锁,这与卵泡发育有关。卵巢中自噬的异常激活导致卵泡闭锁和卵巢功能早衰^[5]。自噬抑制被认为是线粒体功能障碍的一个标志,导致线粒体功能普遍下降,受损线粒体积累和 ROS 产生过多^[17]。本研究表明,在 GCs 的 PCOS 模型中线粒体自噬功能被扰乱和自噬流阻

滞,伴随着 NLRP3 的显著上调。相反,小鼠卵巢(体内)和 GCs 细胞(体外)中 NLRP3 的敲低恢复了线粒体自噬、自噬流并减少了细胞凋亡。大量研究^[18]表明,诱导线粒体自噬可能有效预防氧化应激诱导的 GCs 功能障碍。PINK1/Parkin 介导的泛素依赖性途径在线粒体自噬和维持线粒体完整性和功能中起着重要作用^[19]。本研究结果显示,DHT 诱导的 GCs 细胞中 PINK1 和 Parkin 水平降低。在 PINK1/Parkin 介导的泛素依赖性途径的初始阶段,线粒体膜电位的丧失导致 PINK1 在线粒体外膜上积聚,促发 PINK1 将 Parkin 从细胞质招募到线粒体^[20]。因此,Parkin 的转移是线粒体自噬诱导的关键步骤。在 GCs 的 PCOS 模型中 NLRP3 敲低不仅上调 PINK1 和 Parkin 的表达,而且促进了线粒体自噬和线粒体功能的恢复。相反,正常 GCs 中 NLRP3 过表达模拟 DHT 诱导的线粒体自噬抑制,导致 SVOG 细胞线粒体衍生的氧化应激和凋亡。这些结果表明,NLRP3 作为一种多能分子,在氧化应激过程和线粒体相关的调节中具有多方面的调节作用。

总之,该研究初步揭示了 NLRP3 在 PCOS 中 GCs 凋亡的相关机制。NLRP3 激活诱导的线粒体自噬活性导致线粒体功能障碍并促进 GCs 中线粒体相关凋亡。NLRP3 敲低有利于线粒体稳态,并改善 GCs 对氧化应激损伤的抵抗,从而促进 PCOS 的恢复。该研究提供了一种新的调控 GCs 线粒体功能的机制,并为改善 GCs 功能和减轻卵巢氧化应激损伤提供了一定的理论基础。

参考文献

- [1] Tefagh G, Payab M, Qorbani M, et al. Effect of vitamin E supplementation on cardiometabolic risk factors, inflammatory and oxidative markers and hormonal functions in PCOS (polycystic ovary syndrome): a systematic review and meta-analysis[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 5770. doi:10.1038/s41598-022-09082-3.
- [2] Sadeghi H M, Adeli I, Calina D, et al. Polycystic ovary syndrome: a comprehensive review of pathogenesis, management, and drug repurposing[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(2): 583. doi:10.3390/ijms23020583.
- [3] Zhang Q, Ren J, Wang F, et al. Mitochondrial and glucose metabolic dysfunctions in granulosa cells induce impaired oocytes of polycystic ovary syndrome through Sirtuin 3[J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 187: 1-16. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2022.05.010.
- [4] Wang Y, Yang J, Wang Y, et al. Upregulation of TXNIP contributes to granulosa cell dysfunction in polycystic ovary syndrome via activation of the NLRP3 inflammasome[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2023, 561: 111824. doi:10.1016/j.mce.2022.111824.
- [5] Liu H, Xie J, Fan L, et al. Cryptotanshinone protects against P-

- COS-induced damage of ovarian tissue *via* regulating oxidative stress, mitochondrial membrane potential, inflammation, and apoptosis *via* regulating ferroptosis [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022; 8011850. doi:10.1155/2022/8011850.
- [6] Dabravolski S A, Nikiforov N G, Eid A H, et al. Mitochondrial dysfunction and chronic inflammation in polycystic ovary syndrome [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (8): 3923. doi:10.3390/ijms22083923.
- [7] Li T, Dong G, Kang Y, et al. Increased homocysteine regulated by androgen activates autophagy by suppressing the mammalian target of rapamycin pathway in the granulosa cells of polycystic ovary syndrome mice [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(4): 10875–88. doi:10.1080/21655979.2022.2066608.
- [8] 宋琳奕, 俞瑾, 俞超芹. 多囊卵巢综合征颗粒细胞线粒体功能障碍的研究进展 [J]. *解放军医学杂志*, 2021, 46(7): 718–23. doi:10.11855/j.issn.0577-7402.2021.07.12.
- [8] Song L Y, Yu J, Yu C Q. Research progress on mitochondrial dysfunction of granulosa cells in polycystic ovary syndrome [J]. *Med J Chin People's Liberation Army*, 2021, 46(7): 718–23. doi:10.11855/j.issn.0577-7402.2021.07.12.
- [9] Zhou J, Li H, Wang F, et al. Effects of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid on the expression of NLRP3 inflammasome and autophagy-related proteins as well as the protective effect of *Lycium barbarum* polysaccharide in neonatal rats [J]. *Environ Toxicol*, 2021, 36(12): 2454–66. doi:10.1002/tox.23358.
- [10] Huang Y H, Dong L P, Cui Y G, et al. MiR-520h inhibits viability and facilitates apoptosis of KGN cells through modulating IL6R and the JAK/STAT pathway [J]. *Reprod Biol*, 2022, 22(1): 100607. doi:10.1016/j.repbio.2022.100607.
- [11] Di Emidio G, Rea F, Placidi M, et al. Regulatory functions of L-carnitine, acetyl, and propionyl L-carnitine in a PCOS mouse model; focus on antioxidant/antiglycative molecular pathways in the ovarian microenvironment [J]. *Antioxidants*, 2020, 9(9): 867. doi:10.3390/antiox9090867.
- [12] Huang M, Huang M, Li X, et al. Bisphenol A induces apoptosis through GPER-dependent activation of the ROS/Ca²⁺-ASK1-JNK pathway in human granulosa cell line KGN [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2021, 208: 111429. doi:10.1016/j.ecoenv.2020.111429.
- [13] Wang D, Weng Y, Zhang Y, et al. Exposure to hyperandrogen drives ovarian dysfunction and fibrosis by activating the NLRP3 inflammasome in mice [J]. *Sci Total Environ*, 2020, 745: 141049. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.141049.
- [14] 王诗瑶, 孙贇. NLRP3 炎症小体/IL-1 β 信号通路在子宫内膜异位症中的研究进展 [J]. *国际妇产科学杂志*, 2021, 48(6): 691–5. doi:10.12280/gjfcx.20210484.
- [14] Wang S Y, Sun B /y. Research progress of NLRP3 inflammasome/IL-1 β signaling pathway in endometriosis [J]. *J Int Obstet Gynecol*, 2021, 48(6): 691–5. doi:10.12280/gjfcx.20210484.
- [15] Sun J, Gan L, Lv S, et al. Exposure to Di-(2-Ethylhexyl) phthalate drives ovarian dysfunction by inducing granulosa cell pyroptosis *via* the SLC39A5/NF- κ B/NLRP3 axis [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2023, 252: 114625. doi:10.1016/j.ecoenv.2023.114625.
- [16] Song L, Yu J, Zhang D, et al. Androgen excess induced mitochondrial abnormality in ovarian granulosa cells in a rat model of polycystic ovary syndrome [J]. *Front Endocrinol*, 2022, 13: 789008. doi:10.3389/fendo.2022.789008.
- [17] Huang J C, Duan C C, Jin S, et al. HB-EGF induces mitochondrial dysfunction *via* estrogen hypersecretion in granulosa cells dependent on cAMP-PKA-JNK/ERK-Ca²⁺-FOXO1 pathway [J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(5): 2047–59. doi:10.7150/ijbs.69343.
- [18] Yi S, Zheng B, Zhu Y, et al. Melatonin ameliorates excessive PINK1/Parkin-mediated mitophagy by enhancing SIRT1 expression in granulosa cells of PCOS [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2020, 319(1): E91–101. doi:10.1152/ajpendo.00006.2020.
- [19] Li L, Huang T, Yang J, et al. PINK1/Parkin pathway-mediated mitophagy by AS-IV to explore the molecular mechanism of muscle cell damage [J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2023, 161: 114533. doi:10.1016/j.biopha.2023.114533.
- [20] Xu J, Sun L, Wu C, et al. Involvement of PINK1/Parkin-mediated mitophagy in mitochondrial functional disruption under oxidative stress in vitrified porcine oocytes [J]. *Theriogenology*, 2021, 174: 160–8. doi:10.1016/j.theriogenology.2021.08.028.

Study on the role of mitochondrial autophagy in ovarian inflammation in PCOS based on NLRP3 pathway

Li Yang, Nie Lan, Luo Ting, Liu Honglu, Luo Jiao

(Dept of Infertility and Endocrinology, Hunan Maternal and Child Health Care Hospital, Changsha 410000)

Abstract Objective To explore the role of mitochondrial autophagy in ovarian inflammation associated with polycystic ovary syndrome (PCOS) based on the NOD-like receptor thermoprotein domain-related protein 3 (NLRP3) pathway. **Methods** Human ovarian granulosa cell line SVOG was treated with 25 nmol/L dihydrotestosterone (DHT) for 24 h to establish PCOS cell model. SVOG cells were transfected with adenovirus carrying NLRP3 (Ad-NLRP3) and negative vector (Ad-EV) or NLRP3 shRNA (sh-NLRP3) and negative control (sh-NC) to overexpress or knockdown NLRP3. Mito-Tracker staining and GFP-LC3 staining were used to evaluate mitochondrial autophagy in cells. TUNEL staining, JC-1 staining and Mito-SOX staining were used to analyze the apoptosis, mitochondrial membrane potential and mitochondrial-derived superoxide production. 32 female BALB/c mice were ran-

domly divided into three groups: control (Con) group, DHEA group, DHEA + sh-NC group and DHEA + sh-NLRP3 group, with 8 mice in each group. Except the control group, all other groups treated mice with dehydroepiandrosterone (DHEA) to establish PCOS mouse model. DHEA + sh-NLRP3 group and DHEA + sh-NC group were administrated with sh-NLRP3 or sh-NC encapsulated in lentivirus at a concentration of 1×10^9 TU/ml via tail vein injection. The ultrastructure of mitochondria in ovarian tissue of mice in each group was observed by transmission electron microscope. **Results** Compared with DHT + sh-NC group, the level of NLRP3 of SVOG cells in DHT + sh-NLRP3 group decreased ($P < 0.05$). The co-location of GFP-LC3 and mitochondria in SVOG cells in DHT + sh-NLRP3 group was higher than that in DHT + sh-NC group ($P < 0.05$). Compared with DHT + sh-NC group, the number of TUNEL positive cells and Mito-SOX fluorescence density of SVOG cells in DHT + sh-NLRP3 group decreased, and the ratio of polymer JC-1 to monomer JC-1 increased ($P < 0.05$). Compared with Con + Ad-EV group, the level of NLRP3, the number of TUNEL-positive cells and the fluorescence density of mito-SVOG in Con + Ad-NLRP3 group increased ($P < 0.05$), and the co-location level of GFP-LC3 and mitochondria decreased; the ratio of polymer JC-1 to monomer JC-1 decreased ($P < 0.05$). Compared with the control group, TUNEL positive cells, relative ROS intensity and percentage of damaged mitochondria in the ovarian tissue of mice in DHEA group increased ($P < 0.05$). Compared with DHEA + sh-NC group, TUNEL positive cells, relative ROS intensity and percentage of damaged mitochondria in DHEA + SH-NLRP group decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Inhibition of mitochondrial autophagy induced by activation of NLRP3 leads to mitochondrial dysfunction and promotes mitochondrial-related apoptosis in GCs. Knockdown of NLRP3 is beneficial to mitochondrial homeostasis and improves the resistance of GCs to oxidative stress injury, thus promoting the recovery of PCOS.

Key words NOD-like receptor thermoprotein domain related protein 3; mitochondrial autophagy; polycystic ovary syndrome; oxidative stress; mitochondrial homeostasis; granulosa cells; mice

Fund program Natural Science Foundation of Hunan Province (No. S2023JBMLH1343)

Corresponding author Nie Lan, E-mail: 1557073946@qq.com

(上接第 1572 页)

TCGA database, and lnc-TBL1XR1-5 with closely related c-Myc expression was screened. The effects of c-Myc overexpression and knockdown on lnc-TBL1XR1-5 were detected. Expression relationship of c-Myc and lnc-TBL1XR1-5 in OSCC and para-cancer tissues. Dual-luciferase reporter assays were used to verify the binding of c-Myc to the lnc-TBL1XR1-5 promoter region. RNA FISH were used to determine the localization of lnc-TBL1XR1-5 in OSCC cell lines. The effects of overexpression, knockdown of lnc-TBL1XR1-5 on migration, metabolism, and proliferation of OSCC cells were observed by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR), scratch tests, transwell assays, medium color and pH changes, cell counts, CCK-8 assay, and colony formation assays.

Results It was found that c-Myc positively regulated the expression of lnc-TBL1XR1-5 in OSCC cell lines and tissues. The binding of c-Myc to the lnc-TBL1XR1-5 promoter region was verified by dual-luciferase reporter assays. RNA FISH showed that lnc-TBL1XR1-5 was localized in the nuclei in OSCC cells. Overexpression of lnc-TBL1XR1-5 promoted migration, metabolism and proliferation in OSCC cell lines, while knockdown of it had the opposite effect. **Conclusion** c-Myc positively regulates lnc-TBL1XR1-5 in OSCC. Lnc-TBL1XR1-5 affect the migration, proliferation, and metabolism of OSCC by influencing the tumor microenvironment.

Key words long non-coding RNA; c-Myc; oral squamous cell carcinoma; lnc-TBL1XR1-5; cell proliferation; cell migration

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 31970677); Natural Science Foundation of Anhui Province (No. 2308085Y23)

Corresponding author Zhu Youming, E-mail: 95640021@qq.com