

## 论著·临床研究

## 多囊卵巢综合征患者卵巢颗粒细胞雄激素受体剪接变异体对内分泌激素水平的影响

许晶晶, 石超逸, 刘 晔, 吴琰婷, 黄荷凤

上海交通大学医学院附属国际和平妇幼保健院胚胎源性疾病研究所, 上海市胚胎源性疾病重点实验室, 上海 200030

**【摘要】目的**·探讨多囊卵巢综合征 (polycystic ovarian syndrome, PCOS) 患者卵巢颗粒细胞雄激素受体插入型剪接变异体 (androgen receptor splice variant insertion isoform, AR-ins) 对性激素及胰岛素水平的影响。**方法**·纳入 2017 年 6 月—2018 年 6 月于上海交通大学医学院附属国际和平妇幼保健院辅助生殖科行体外受精—胚胎移植的 154 例 PCOS 患者 (PCOS 组) 和 79 例正常排卵患者 (对照组)。通过病史摘录收集其社会人口学信息、血清基础性激素及胰岛素数据, 其中激素水平由化学发光法检测。收集所有患者的卵巢颗粒细胞及卵泡液。采用巢式 PCR 鉴定 PCOS 患者卵巢颗粒细胞中的雄激素受体剪接变异体, 进一步将 PCOS 组患者分为 PCOS 野生型 (wild type, Wt) 组 (39 例) 和 PCOS AR-ins 组 (115 例)。利用化学发光法检测 3 组患者卵泡液中的性激素及胰岛素水平, 计算游离雄激素指数 (free androgen index, FAI)。采用 One-way ANOVA、Welch's ANOVA、Kruskal-Wallis  $H$  检验和  $\chi^2$  检验比较 3 组患者的社会人口学信息、血清及卵泡液的性激素及胰岛素水平的差异。**结果**·与对照组相比, PCOS AR-ins 组患者血清中性激素结合球蛋白 (sex hormone-binding globulin, SHBG) 水平显著降低 ( $P=0.000$ ), 总睾酮 (total testosterone, TT) 水平 ( $P=0.000$ )、胰岛素水平 ( $P=0.001$ ) 及 FAI ( $P=0.000$ ) 均显著增高。分别与对照组和 PCOS Wt 组相比, PCOS AR-ins 组患者卵泡液中 SHBG、TT、胰岛素水平及 FAI 间的差异均具有统计学意义 (均  $P<0.05$ )。**结论**·存在 AR-ins 的 PCOS 患者血清中具有高雄激素和高胰岛素的特点, 而在其卵巢局部此效应更为显著。

**【关键词】** 多囊卵巢综合征; 雄激素受体; 剪接变异体; 高雄激素; 胰岛素抵抗

**【DOI】** 10.3969/j.issn.1674-8115.2019.11.010 **【中图分类号】** R711.75 **【文献标志码】** A

## Effect of ovarian granulosa cell androgen receptor splice variant on endocrine hormone levels in patients with polycystic ovary syndrome

XU Jing-jing, SHI Chao-yi, LIU Ye, WU Yan-ting, HUANG He-feng

Shanghai Key Laboratory of Embryo Original Diseases, Institute of Embryo Original Diseases, The International Peace Maternity &amp; Child Health Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200030, China

**【Abstract】Objective**·To investigate the effects of ovarian granulosa cell androgen receptor splice variant insertion isoform (AR-ins) on the levels of sex hormones and insulin in patients with polycystic ovary syndrome (PCOS). **Methods**·Seventy-nine control patients (control group) of normal ovulation and one hundred and fifty-four PCOS patients (PCOS group) who received *in vitro* fertilization embryo transfer in the Assisted Reproductive Department of the International Peace Maternity & Child Health Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine from Jun. 2017 to Jun. 2018 were recruited. The sociodemographic information, serum basic hormones and insulin data were collected according to medical history record, and the hormone levels were measured by chemiluminescence. The ovarian granulosa cells and follicular fluids of all the patients were collected. Nested PCR was used to identify the androgen receptor splice variant (AR SV) in the ovarian granulosa cells from PCOS patients, and then they were divided into two groups, *i.e.*, PCOS Wt group ( $n=39$ ) and PCOS AR-ins group ( $n=115$ ). The levels of sex hormones and insulin in follicular fluids of the three groups were detected by chemiluminescence. The free androgen index (FAI) was calculated. The sociodemographic information, the levels of sex hormones and insulin in serum and follicular fluid of the three groups were compared by One-way ANOVA, Welch's ANOVA, Kruskal-Wallis  $H$  test and chi-square test. **Results**·Compared with the control group, the levels of serum sex hormone-binding globulin (SHBG) were significantly lower in the PCOS AR-ins group ( $P=0.000$ ), and the levels of serum total testosterone (TT) ( $P=0.000$ ), insulin ( $P=0.001$ ) and FAI ( $P=0.000$ ) were significantly higher in the PCOS AR-ins group. Compared with the control group and the PCOS Wt group, the differences of SHBG, TT, insulin levels and FAI in the follicular fluid in the PCOS AR-ins group were statistically significant (all  $P<0.05$ ). **Conclusion**·PCOS patients with AR-ins have high androgen and insulin levels in serum, and this effect is more pronounced in the ovarian local microenvironment.

**【Key words】** polycystic ovary syndrome (PCOS); androgen receptor (AR); splice variant (SV); high androgen; insulin resistance (IR)

**【基金项目】** 国家自然科学基金面上项目 (81671412); 上海交通大学医学院“紧缺专业硕士研究生临床研究能力提升计划” (JQ201717) (General Program of National Natural Science Foundation of China, 81671412; Clinical Skills Improvement Foundation of Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, JQ201717)。

**【作者简介】** 许晶晶 (1993—), 女, 硕士生; 电子信箱: xujingjing\_0922@163.com。

**【通信作者】** 黄荷凤, 电子信箱: huanghefg@sjtu.edu.cn。

多囊卵巢综合征 (polycystic ovarian syndrome, PCOS) 是青春期及育龄期女性最为常见的生殖内分泌疾病, 也是导致其不孕的最常见因素。临床上, PCOS 表现为雄激素过高、持续无排卵、卵巢多囊样改变等<sup>[1]</sup>。一项针对 PCOS 的不同诊断标准研究 PCOS 患病率的 meta 分析显示, 根据美国国立卫生研究院的诊断标准, 有 5% ~ 8% 的育龄期女性被诊断患有 PCOS; 根据鹿特丹标准, 则该比例上升为 8% ~ 13%<sup>[2]</sup>。PCOS 常伴有代谢异常, 其中胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 是最重要的临床特征之一。研究<sup>[1]</sup>表明, 有 44% ~ 85% 的 PCOS 女性伴有 IR, 而 IR 可能引发更为严重的糖耐量异常 (impaired glucose tolerance, IGT) 和 2 型糖尿病 (diabetes mellitus type 2, T2DM)。

可变剪接是 mRNA 前体通过不同的剪接方式产生不同的 mRNA 剪接变体 (splice variant, SV) 的过程。该过程不仅可以解释单基因如何产生多种 mRNA, 还可以解释细胞如何从有限的基因中产生多样复杂的蛋白, 但过程中产生的 SV 可能诱发各种病理状态。雄激素受体 (androgen receptor, AR) 是一种甾体激素受体转录因子, 表达于卵细胞、卵泡膜细胞、卵巢颗粒细胞上, 可分别在卵巢甾体激素代谢及卵子发生、发育、成熟、排卵的过程中发挥重要调节作用<sup>[3]</sup>。目前, 针对 AR SV 的研究大多集中于前列腺癌<sup>[4]</sup>, 鲜少有关于其在女性生殖方面的作用研究。本课题组的前期研究<sup>[5]</sup>已证实, PCOS 患者卵巢颗粒细胞中除了野生型 (wild type, Wt) AR, 还存在 2 种 AR SV, 即插入型 (AR-ins) 和缺失型 (AR-del); 经进一步测序后结果显示, AR-ins 保留了 AR 第二内含子 (intron2) 末尾的一段 69 个核苷酸的序列 (ivs2), 而 AR-del 则缺失了整个第三外显子 (exon3); 经蛋白晶体结构分析发现, AR-ins 蛋白的 DNA 结合域 (DNA binding domain, DBD) 第二锌指结构中的  $\alpha$  螺旋发生了改变, 而 AR-del 蛋白则是缺失了整个第二锌指结构; 而在体外实验中, 分别在人卵巢颗粒细胞中过表达 Wt AR 和另外 2 种 AR SV 时发现: 与过表达 Wt AR 组相比, 过表达 AR-ins 组细胞培养上清液中雄激素水平显著升高, 过表达 AR-del 组则无显著性差异。一项 meta 分析研究<sup>[6]</sup>显示, 高雄激素的 PCOS 患者发生代谢综合征的风险较高。另一项研究<sup>[7]</sup>对 PCOS 患者进行持续血糖监测, 结果发现高雄激素的 PCOS 患者具有更高的血糖值。然而, AR-ins 作为一种识别 PCOS 患者高雄激素临床特征的重要生物标志, 是否能够影响其他性激素及胰岛素的水平, 目前尚未有研究涉及。

基于此, 本研究通过对 PCOS 患者卵巢颗粒细胞中

AR SV 及血清、卵泡液中的激素水平进行分析, 探究 AR-ins 对 PCOS 患者性激素及胰岛素水平的影响, 以期为后续 PCOS 的发病机制研究及个性化诊疗提供依据。

## 1 对象和方法

### 1.1 研究对象

本研究共纳入 2017 年 6 月—2018 年 6 月于上海交通大学医学院附属国际和平妇幼保健院辅助生殖科就诊的行第一次体外受精—胚胎移植 (*in vitro* fertilization and embryo transfer, IVF-ET) 助孕的 PCOS 患者 154 例 (PCOS 组) 及正常排卵患者 79 例 (对照组)。入组对象年龄为 22 ~ 40 岁。

PCOS 组的纳入标准参照 2003 年由 PCOS 国际协作组发布的鹿特丹标准, 符合下列 2 项及以上并排除诱发雄激素过多的其他病因 (如先天性肾上腺皮质增生、库欣综合征、雄激素分泌性肿瘤等) 者即被诊断患有 PCOS: ①具有高雄激素的临床表现和/或患有高雄激素血症。②稀发排卵或无排卵。③卵巢多囊样改变。PCOS 组的排除标准: ①存在内分泌系统的其他疾病, 如糖尿病、代谢综合征等。②合并除输卵管因素外的其他不孕病因, 如子宫内膜异位症、生殖道畸形等。③病史信息缺失过多。

对照组的纳入标准: ①仅因单纯输卵管阻塞或男方因素行 IVF-ET 助孕。②月经周期规则 (26 ~ 35 d), 排卵正常。③卵巢储备功能正常。④卵巢形态正常。对照组的排除标准同 PCOS 组排除标准。

本研究已通过上海交通大学医学院附属国际和平妇幼保健院伦理委员会的审批 (审批号 GKLW2015-42)。所有研究对象均已签署知情同意书。

### 1.2 方法

**1.2.1 临床资料收集** 通过病史摘录收集 PCOS 组与对照组患者的临床资料: ①社会人口学资料, 包括患者的年龄、身高、体质量、体质量指数 (body mass index, BMI)、教育水平、户籍。②既往史, 包括月经史、不孕史、疾病史、手术史及用药史。③血清基础性激素水平, 即在基础状态下于月经周期或黄体酮撤退性出血第 2 ~ 4 日检测患者外周血清中卵泡刺激素 (follicle stimulating hormone, FSH)、促黄体生成素 (luteinizing hormone, LH)、雌二醇 (estradiol,  $E_2$ )、泌乳素 (prolactin, PRL)、孕酮 (progesterone, P)、总睾酮 (total testosterone, TT)、硫酸脱氢表雄酮 (dehydroepiandrosterone-sulfate,

DHEA-S)、性激素结合球蛋白 (sex hormone-binding globulin, SHBG)。④血清胰岛素水平, 与血清基础性激素同时采集并检测。⑤B超数据, 通过B超检测患者双侧卵巢卵泡发育情况及有无生殖道畸形等。其中, 血清性激素和胰岛素水平由上海交通大学医学院附属国际和平妇幼保健院检验科利用 UniCel DxI 800 仪器 (Beckman, 美国) 通过化学发光法检测。

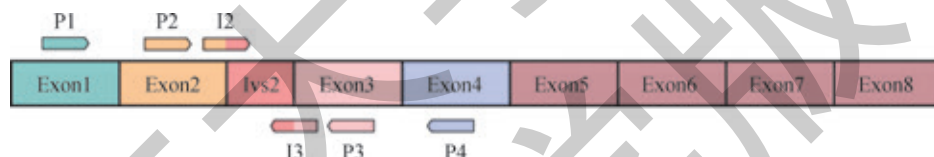
**1.2.2 临床标本采集** 在 IVF-ET 过程中, 于阴道超声指导下取卵, 并收集第一管澄清卵泡液冻存于  $-80^{\circ}\text{C}$ , 后续检测卵泡液中激素水平时取出。待实验室技术人员分拣所有卵冠丘复合体后, 收集冲洗液, 采用密度梯度离心法分离提取卵巢颗粒细胞, 于  $-80^{\circ}\text{C}$  冻存, 待后续鉴定 AR SV 时取出。

**1.2.3 AR SV 鉴定及分组** 利用 TRIzol 提取 PCOS 组患者的卵巢颗粒细胞 RNA, 去基因组 DNA 后反转录为 cDNA。利用巢式 PCR 鉴定 PCOS 组患者卵巢颗粒细胞中的 AR SV, 引物序列见表 1, 扩增方案 (图 1) 如下: ①第一步 PCR, 采用位于第一外显子中的正向引物 P1 和

第四外显子中的反向引物 P4, 扩增第二和第三外显子。②第二步 PCR, 以第一步 PCR 产物作为模板, 采用位于第二外显子中的正向引物 P2 和第三外显子中的反向引物 P3, 扩增第二、三外显子的连接处。③第三步 PCR, 以第一步 PCR 产物作为模板, 采用位于第二外显子与插入区域连接处的正向引物 I2 和插入区域与第三外显子连接处的反向引物 I3, 扩增插入区域。以上试剂均购买自宝日医生物技术 (北京) 有限公司, 引物均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

表 1 巢式 PCR 的引物序列  
Tab 1 Primer sequences for nested PCR

引物名称	引物序列 (5' → 3')
P1	GTCAAAAGCGAAATGGGCCCC
P2	ACCTGCCTGATCTGTGGAGAT
P3	TAGTGAATCATTCTGCTGG
P4	CTTCTGGGTTGTCTCCTCAGT
I2	AGCCGCTGAAGAAATACCC
I3	TCTGTTTCCCTGGGAGAACAA



注: 第一步 PCR 引物为 P1 和 P4, 第二步 PCR 引物为 P2 和 P3, 第三步 PCR 引物为 I2 和 I3

图 1 巢式 PCR 鉴定 AR SV 的扩增模式图

Fig 1 Amplification pattern of AR SV identified by nested PCR

根据巢式 PCR 的结果, PCOS 组患者被分为如下 2 组。满足下列 2 项的 PCOS 患者即为 PCOS AR-ins 组: ①第二步 PCR 产物出现 206 bp、137 bp 双条带。②第三步 PCR 产物出现 90 bp 单条带。满足下列 2 项的 PCOS 患者即为 PCOS Wt 组: ①第二步 PCR 产物仅出现 137 bp 单条带。②第三步 PCR 未出现条带。

**1.2.4 卵泡液中性激素及胰岛素水平检测** 利用 UniCel DxI 800 仪器通过化学发光法检测卵泡液中 TT、DHEA-S、SHBG 和胰岛素的水平, 并计算游离雄激素指数 (free androgen index, FAI)<sup>[8]</sup>, 公式为  $\text{FAI} = \text{TT} / \text{SHBG} \times 100$ 。从 PCOS Wt 组和 PCOS AR-ins 组各取 5 份卵泡液、对照组取 10 份卵泡液开展预实验, 评估上述 4 种激素的最适送检量及稀释比例。

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS 25.0 软件对研究数据进行统计分析。连

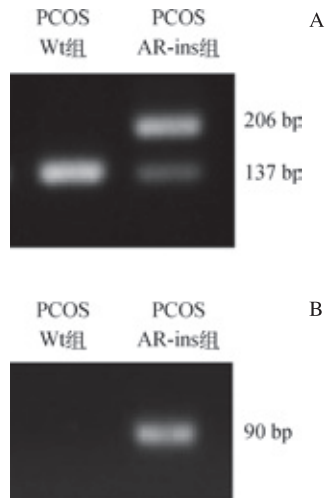
续变量且为正态分布的数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 连续变量为偏态分布的数据以  $M (Q_1, Q_3)$  表示, 分类变量以百分比 (%) 表示。针对 3 组患者的社会人口学信息, 血清及卵泡液的性激素及胰岛素水平进行假设检验, 若为正态分布且方差齐, 采用 One-way ANOVA、事后 Scheffe 多重比较; 若为正态分布但方差不齐, 采用 Welch's ANOVA、事后 Games-Howell 多重比较; 若为非正态分布, 采用 Kruskal-Wallis  $H$  检验; 若为分类变量, 采用  $\chi^2$  检验。  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 AR SV 的鉴定

本研究共纳入 PCOS 患者 154 例、正常排卵患者 79 例。利用优化的巢式 PCR, 根据 PCOS 组患者卵巢颗粒细胞中是否存在 AR-ins, 将其分为 PCOS Wt 组、PCOS

AR-ins 组。经 AR SV 鉴定及巢式 PCR 结果 (图 2) 显示, PCOS Wt 组共纳入 39 例患者, PCOS AR-ins 组共纳入 115 例患者。



注: A. 第二步 PCR 产物条带; B. 第三步 PCR 产物条带

图 2 巢式 PCR 鉴定 AR SV 的核酸凝胶电泳显影图

Fig 2 Nucleic acid gel electrophoresis images of AR SV identification via nested PCR

2.2 社会人口学资料分析

采用 One-way ANOVA 及  $\chi^2$  检验对患者的社会人口学资料进行分析, 结果 (表 2) 显示 3 组患者的年龄、身高、教育水平和户籍间差异均无统计学意义; 而与对照组相比, PCOS AR-ins 组患者的体质量、BMI 均较高 ( $P=0.001$ ,  $P=0.003$ )。

表 2 3 组患者的社会人口学资料分析

Tab 2 Analysis of sociodemographic information of the 3 groups

项目	对照组 (N=79)	PCOS Wt 组 (N=39)	PCOS AR-ins 组 (N=115)
年龄 / 岁	30.38 ± 0.40	31.82 ± 0.72	31.68 ± 0.32
身高 / cm	161.03 ± 0.51	161.47 ± 0.97	161.50 ± 1.66
体质量 / kg	57.85 ± 1.05	61.73 ± 1.56	63.14 ± 0.91 <sup>①</sup>
BMI / (kg/m <sup>2</sup> )	22.27 ± 0.36	23.64 ± 0.49	24.02 ± 0.36 <sup>②</sup>
教育水平 / n (%)			
初中及其以下	11 (13.92)	4 (10.26)	17 (14.78)
高中或中专	12 (15.19)	6 (15.38)	8 (6.96)
大学本科或大专	51 (64.56)	28 (71.79)	85 (73.91)
研究生及其以上	5 (6.33)	1 (2.56)	5 (4.35)
户籍 / n (%)			
本市	27 (34.18)	16 (41.03)	55 (47.83)
外地	52 (65.82)	23 (58.97)	60 (52.17)

注: <sup>①</sup>  $P=0.001$ , <sup>②</sup>  $P=0.003$ , 与对照组比较

2.3 血清中基础性激素及胰岛素水平分析

通过病史摘录收集患者基础状态下于月经周期或黄体酮撤退性出血第 2 ~ 4 日的外周血清各项基础性激素及胰岛素水平, 采用 Kruskal-Wallis  $H$  检验进行比较, 结果 (表 3) 显示, 3 组患者的雄激素相关激素水平存在较大差异: 与对照组相比, PCOS Wt 组和 PCOS AR-ins 组患者的血清 TT 水平、DHEA-S 水平、FAI 均较高 (均  $P<0.05$ ), 而上述指标在 PCOS Wt 组与 PCOS AR-ins 组之间差异则无统计学意义。与对照组相比, PCOS AR-ins 组患者血清 SHBG 水平较低 ( $P=0.000$ ), 而血清胰岛素水平则较高 ( $P=0.001$ )。

表 3 3 组患者血清中基础性激素及胰岛素水平分析

Tab 3 Analysis of basic sex hormones and insulin levels in serum of the 3 groups

项目	对照组 (N=79)	PCOS Wt 组 (N=39)	PCOS AR-ins 组 (N=115)
E <sub>2</sub> / (pmol/L)	151.00 (115.00, 192.00)	151.00 (108.00, 210.00)	157.00 (102.25, 216.50)
P / (nmol/L)	1.90 (1.25, 2.80)	1.75 (1.20, 2.50)	1.80 (1.20, 2.80)
PRL / (μg/L)	11.80 (9.85, 16.25)	14.60 (10.10, 19.90)	11.50 (8.70, 16.60)
LH / (U/L)	4.60 (3.60, 6.10)	5.10 (3.40, 9.10)	4.90 (3.00, 7.30)
FSH / (U/L)	7.40 (6.60, 9.40)	7.40 (6.30, 8.70)	7.50 (6.40, 9.90)
LH/FSH	0.59 (0.44, 0.83)	0.77 (0.54, 1.15)	0.58 (0.38, 1.03)
TT / (nmol/L)	1.60 (1.10, 1.90)	2.10 (1.60, 2.70) <sup>①</sup>	1.90 (1.40, 2.70) <sup>②</sup>
DHEA-S / (μg/dL)	205.00 (147.00, 266.00)	256.50 (209.75, 333.25) <sup>③</sup>	250.00 (203.00, 314.00) <sup>④</sup>
SHBG / (nmol/L)	106.00 (68.90, 145.40)	59.50 (40.95, 109.58)	45.55 (28.85, 95.35) <sup>⑤</sup>
FAI	1.48 (0.94, 2.92)	2.75 (1.40, 4.18) <sup>⑥</sup>	4.18 (1.86, 7.24) <sup>⑦</sup>
胰岛素 / (mU/L)	7.90 (5.46, 18.35)	14.58 (5.34, 26.27)	15.59 (8.33, 38.80) <sup>⑧</sup>

注: <sup>①</sup>  $P=0.000$ , <sup>②</sup>  $P=0.022$ , <sup>③</sup>  $P=0.042$ , <sup>④</sup>  $P=0.001$ , 与对照组比较



2.4 卵泡液中雄激素相关激素及胰岛素水平分析

在阴道超声指导下的取卵过程中, 收集患者的卵泡液并检测雄激素相关激素的水平, 采用 Kruskal-Wallis *H* 检验进行比较, 结果 (表 4) 显示 PCOS AR-ins 组患者的 TT 水平最高, 且与其他 2 组间差异均具有统计学意义 (均  $P<0.05$ ); 与对照组相比, PCOS AR-ins 组患者

的 DHEA-S 水平较高 ( $P=0.000$ ), 而 PCOS Wt 组患者的 DHEA-S 水平虽然也较高但差异无统计学意义; PCOS AR-ins 组患者的 SHBG 水平最低, 且与其余 2 组间差异均具有统计学意义 (均  $P<0.05$ ); 同时, PCOS AR-ins 组患者卵泡液中 FAI、胰岛素水平均显著高于其余 2 组 (均  $P<0.05$ )。

表 4 3 组患者的卵泡液中激素水平分析  
Tab 4 Analysis of hormone levels in follicular fluids of the 3 groups

项目	对照组 (N=79)	PCOS Wt 组 (N=39)	PCOS AR-ins 组 (N=115)
TT/(nmol/L)	17.37 (14.00, 21.50)	18.65 (12.90, 22.58)	21.30 (16.65, 26.34) <sup>①②</sup>
DHEA-S/(μg/dL)	175.00 (134.75, 217.25)	194.00 (164.25, 266.25)	232.00 (180.00, 399.00) <sup>③</sup>
SHBG/(nmol/L)	128.10 (81.75, 159.43)	71.20 (53.20, 144.30)	54.30 (33.60, 91.30) <sup>③④</sup>
FAI	13.96 (9.93, 20.20)	24.30 (12.83, 33.14)	35.53 (21.28, 66.57) <sup>③⑤</sup>
胰岛素/(mU/L)	1.45 (0.68, 2.72)	2.12 (0.98, 5.14)	4.06 (2.07, 8.12) <sup>③⑥</sup>

注: <sup>①</sup>  $P=0.001$ , <sup>②</sup>  $P=0.000$ , 与对照组比较; <sup>③</sup>  $P=0.048$ , <sup>④</sup>  $P=0.026$ , <sup>⑤</sup>  $P=0.005$ , <sup>⑥</sup>  $P=0.020$ , 与 PCOS Wt 组比较

3 讨论

本课题组前期研究<sup>[5]</sup>发现, PCOS 患者卵巢颗粒细胞中存在 2 种 AR SV, 即 AR-ins 和 AR-del, 且体外实验证实 AR-ins 与高雄激素状态相关, 但关于 AR-ins 对其他性激素及胰岛素水平会产生何种影响尚不清楚。因此, 本研究通过对 154 例 PCOS 患者和 79 例对照组患者的卵巢颗粒细胞的 AR SV 表达进行鉴定, 结果发现 PCOS AR-ins 组患者血清中各项雄激素相关激素及胰岛素水平均显著高于对照组, 但与 PCOS Wt 组无显著差异; 而在卵泡液中, 此种效应更为显著, 且 PCOS AR-ins 组患者与 PCOS Wt 组间亦出现了显著差异。

本研究利用巢式 PCR 建立了一套优化的 AR SV 鉴定体系。前期研究<sup>[5]</sup>将卵巢颗粒细胞中 AR 的外显子连接处进行逐个 PCR 鉴定, 最终发现部分 PCOS 患者的第一外显子和第四外显子之间存在 2 种可变剪接。本研究依据前期研究的鉴定方案, 在扩大样本鉴定过程中发现不同患者卵巢颗粒细胞 AR SV 的表达丰度存在差异, 而在 Wt AR 表达量较高的情况下, PCR 反应过程中引物会优先结合 Wt AR 进行扩增。因此, 仅通过一步 PCR 扩增得到的 AR SV PCR 产物可能浓度较低, 经核酸凝胶显影后条带较弱以致辨别不清。基于此, 本研究利用巢式 PCR 进一步“钓取”AR SV, 不仅可以较大程度地提高鉴定准确性还可以实现较精确的分组, 为后续内分泌激素的分析及临床干预研究提供了有利条件。值得注意的是, 利用该优化的鉴定体系, 存在 AR-ins 的 PCOS 患者检出率得到了明

显提升。

本研究通过比较 3 组患者的社会人口学资料发现, PCOS AR-ins 组患者的 BMI 较高。目前认为, 肥胖与 PCOS 的发病密切相关。一项针对 PCOS 女性超重、肥胖、中心性肥胖的 meta 分析<sup>[9]</sup>显示, 与非 PCOS 女性相比, PCOS 女性患有超重、肥胖和中心性肥胖的风险均有明显增加。考虑到人种差异, Chen 等<sup>[10]</sup>开展了一项中国无差别研究, 结果显示在参与调查的 PCOS 女性中有 20% 的女性超重, 而在整体研究人群中超重仅占比 7.5%、肥胖仅占比 1.3%, 继而提示 PCOS 女性中超重的患病率显著高于整体研究人群。另外, 雄激素过多也被证实与腹部脂肪的堆积<sup>[11]</sup>、胰岛  $\beta$  细胞功能的损害<sup>[12]</sup>相关。中心性肥胖被认为是代谢综合征的重要表征之一, 有研究<sup>[13]</sup>显示与体质量相匹配的对照组相比, 典型的 PCOS 中心性肥胖女性具有较高的 FAI, 并表现出较为明显的胰岛素不敏感特性。研究<sup>[14]</sup>发现, 腰臀比是判断中心性肥胖的最为简便经济的指标, 但由于本研究收集的 IVF 建档档案资料中缺失腰臀比的记录, 因此导致无法比较 3 组患者的中心性肥胖情况, 这也是本研究的局限性之一。

DHEA-S 被认为是反映肾上腺源性雄激素分泌的指标<sup>[15]</sup>。研究<sup>[16]</sup>显示, 有 20% ~ 30% 的 PCOS 女性表现为过量产生肾上腺前体雄激素, 其中 DHEA 的占比最大; 但由于 DHEA 的分泌具有昼夜波动的特性, 且卵巢亦能够分泌 20% ~ 30% 的 DHEA, 而其硫酸化产物 DHEA-S 则几乎均由肾上腺分泌, 且浓度在整个月经周期中相对稳定。因此, 检测 DHEA-S 的水平能够更加方便观测肾上腺



源性雄激素分泌<sup>[16]</sup>。目前,关于PCOS中肾上腺源性雄激素分泌过多的机制研究尚不清楚。

IR是PCOS代谢异常的核心环节,当生理浓度的胰岛素不足以维持正常的血糖水平时,机体代偿性增加胰岛素的分泌可造成高胰岛素血症,而过量的胰岛素又通过多种方式进一步刺激雄激素生成,从而降低肝脏SHBG的生成,使循环中发挥实际作用的游离雄激素水平增加<sup>[17]</sup>:①作用于卵巢,可增强卵巢雄激素合成酶的活性,同时与卵巢组织的胰岛素受体结合,增加卵巢雄激素的合成<sup>[18]</sup>。②促进垂体释放LH,可直接刺激卵泡膜细胞产生雄激素<sup>[19]</sup>。③还可通过抑制肝脏合成胰岛素样生长因子结合球蛋白1,使胰岛素样生长因子1水平升高,亦刺激雄激素合成及分泌<sup>[20]</sup>。反之,高雄激素血症也可促进IR的发生。通过在小鼠体内注射DHEA或双氢睾酮(dihydrotestosterone, DHT)构建高雄激素血症模型鼠发现,小鼠出现了一系列与PCOS患者类似的表型特征,如动情周期紊乱、不产仔、肥胖、糖耐量受损、IR等<sup>[21]</sup>。研究者在注射DHEA构建的高雄激素血症模型鼠中发现,小鼠骨骼肌细胞中哺乳动物雷帕霉素靶蛋白敏感型复合体(mammalian target of rapamycin complex 1, mTORC1)的表达量明显增高,其增加抑制了细胞自噬的发生,使线粒体功能受损,从而使骨骼肌细胞中由胰岛素介导的葡萄糖转运减少、外周血血糖水平提升,继而进一步刺激胰岛β细胞释放胰岛素,造成高血糖、IR共存现象<sup>[22]</sup>。综上,高胰岛素血症、IR、高雄激素血症三者可形成恶性循环,导致PCOS患者代谢发生异常,而三者中的因果关系目前尚无定论。

在PCOS诊断标准的研究<sup>[23]</sup>中,雄激素水平一直是较为重要的考量指标。但临床上,常以TT水平反映雄激素水平。然而在血液中,实际发挥作用的则是游离睾酮(free testosterone, FT),仅占TT水平中的1%~2%<sup>[24]</sup>。研究<sup>[24]</sup>显示,血液中大部分睾酮可与SHBG结合,而仅有极少部分与白蛋白、其他低结合力蛋白相结合。一项针对PCOS患者临床检测中血清TT、FT、FAI水平生物学变异系数的研究<sup>[25]</sup>指出,PCOS患者和正常对照女性的血清TT水平范围区间存在重叠,而FAI区间无重叠。考虑到FAI能够校正SHBG对雄激素水平的影响,从而获得相对准确的游离雄激素水平,因此我们针对SHBG水平进行检测并计算FAI,以评估各组的FT水平。在本研究中,无论是在血清还是在卵泡液中,PCOS AR-ins组患者均具有较高的雄激素水平,尤其在卵泡液中,PCOS AR-ins组患者的FAI显著高于PCOS Wt组,继而提示存在AR-ins

的PCOS患者卵巢局部的高雄激素状态更为严重。此结果与本课题组的前期研究<sup>[5]</sup>相一致。前期研究<sup>[5]</sup>发现,与过表达Wt AR组相比,过表达AR-ins组细胞培养上清中雄激素水平显著升高。分析其原因可能如下:一方面,当细胞质中的AR-ins受到DHT刺激时,其核转位能力有所下降,导致其大量滞留于细胞质而无法入核发挥AR经典的转录作用<sup>[26]</sup>;另一方面,即使有少量的AR-ins成功入核,其与芳香化酶基因(*CYP17A1*)启动子区的雄激素反应元件的结合能力也非常低,继而影响芳香化酶的转录,抑制雄激素向雌激素的转化,导致雄激素的堆积<sup>[5]</sup>。另外,由*CYP17A1*编码的细胞色素P450 17α羟化酶能够促进卵巢雄激素的生成,但在常规状态下该羟化酶处于抑制状态。前期研究<sup>[5]</sup>还发现,与正常对照患者相比,存在AR-ins的PCOS患者的卵巢颗粒细胞中*CYP17A1* mRNA为高表达,这又进一步促进了高雄激素的产生。值得注意的是,AR-ins的首次发现是在一项关于转移性前列腺癌的研究中<sup>[27]</sup>,其被命名为AR23;且该研究发现,存在AR23的患者会出现去势激素治疗抵抗的现象;而进一步体外实验发现,经DHT刺激后AR23定位于细胞质内质网上,未发生入核。该结果与本课题组在人卵巢颗粒细胞中的研究结果相符。在探究PCOS患者AR SV产生来源时,本课题组的前期研究虽未在保守序列区发现DNA突变,但在其中1例存在AR-ins的PCOS患者中发现其插入区域单个核苷酸是杂合的(C/T),猜测可能是由C等位基因的杂合突变导致了AR-ins的产生,表明AR SV的产生并非随机而是有规律可循<sup>[5]</sup>;继而推测,一些表观遗传修饰如DNA甲基化、组蛋白乙酰化等可能亦在剪接变异体调控中发挥了重要作用,而详细机制的探索有待于更进一步的研究。

综上所述,本课题组的前期研究<sup>[5]</sup>已证实AR-ins与PCOS患者高雄激素的产生相关,而本研究在进一步扩大样本量、优化鉴定体系的基础上,通过分析血清及卵泡液中多种雄激素相关激素及重要性激素的水平发现,SHBG水平的降低可促进雄激素水平的进一步升高;同时,本研究分别检测血清及卵泡液中的胰岛素水平发现,存在AR-ins的PCOS患者的胰岛素水平较高。基于以上发现,我们得出结论:存在AR-ins的PCOS患者的卵巢局部处于高雄激素状态,同时伴有IR。本研究从可变剪接这一基因转录后调控机制入手,研究AR-ins对PCOS患者性激素及胰岛素水平的影响,为PCOS发病机制的阐明提供了线索,也为今后PCOS的个性化诊疗策略提供一定的参考。

## 参·考·文·献

- [1] McCartney ChR, Marshall JC. Polycystic ovary syndrome[J]. *N Engl J Med*, 2016, 375(14): 1398-1399.
- [2] Bozdog G, Mumusoglu S, Zengin D, et al. The prevalence and phenotypic features of polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis[J]. *Hum Reprod*, 2016, 31(12): 2841-2855.
- [3] Walters KA, Allan CM, Handelsman DJ. Androgen actions and the ovary[J]. *Biol Reprod*, 2008, 78(3): 380-389.
- [4] Paschalis A, Sharp A, Welti JC, et al. Alternative splicing in prostate cancer[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018, 15(11): 663-675.
- [5] Wang F, Pan J, Liu Y, et al. Alternative splicing of the androgen receptor in polycystic ovary syndrome[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(15): 4743-4748.
- [6] Yang R, Yang S, Li R, et al. Effects of hyperandrogenism on metabolic abnormalities in patients with polycystic ovary syndrome: a meta-analysis[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2016, 14(1): 67.
- [7] Zhu JP, Teng YC, Zhou J, et al. Increased mean glucose levels in patients with polycystic ovary syndrome and hyperandrogenemia as determined by continuous glucose monitoring[J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2013, 92(2): 165-171.
- [8] Mathur RS, Moody LO, Landgrebe S, et al. Plasma androgens and sex hormone-binding globulin in the evaluation of hirsute females[J]. *Fertil Steril*, 1981, 35(1): 29-35.
- [9] Lim SS, Davies MJ, Norman RJ, et al. Overweight, obesity and central obesity in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis[J]. *Hum Reprod Update*, 2012, 18(6): 618-637.
- [10] Chen X, Yang D, Mo Y, et al. Prevalence of polycystic ovary syndrome in unselected women from southern China[J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2008, 139(1): 59-64.
- [11] Dumesic DA, Akopians AL, Madrigal VK, et al. Hyperandrogenism accompanies increased intra-abdominal fat storage in normal weight polycystic ovary syndrome women[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2016, 101(11): 4178-4188.
- [12] Condorelli RA, Calogero AE, Di Mauro M, et al. Androgen excess and metabolic disorders in women with PCOS: beyond the body mass index[J]. *J Endocrinol Invest*, 2018, 41(4): 383-388.
- [13] Lim SS, Norman RJ, Davies MJ, et al. The effect of obesity on polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis[J]. *Obes Rev*, 2013, 14(2): 95-109.
- [14] Ashwell M, Gibson S. Waist-to-height ratio as an indicator of 'early health risk': simpler and more predictive than using a 'matrix' based on BMI and waist circumference[J]. *BMJ Open*, 2016, 6(3): e010159.
- [15] Labrie F, Luu-The V, Bélanger A, et al. Is dehydroepiandrosterone a hormone?[J]. *J Endocrinol*, 2005, 187(2): 169-196.
- [16] Goodarzi MO, Carmina E, Azziz R. DHEA, DHEAS and PCOS[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2015, 145: 213-225.
- [17] Nestler JE, Powers LP, Matt DW, et al. A direct effect of hyperinsulinemia on serum sex hormone-binding globulin levels in obese women with the polycystic ovary syndrome[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1991, 72(1): 83-89.
- [18] Wu S, Divall S, Nwaopara A, et al. Obesity-induced infertility and hyperandrogenism are corrected by deletion of the insulin receptor in the ovarian theca cell[J]. *Diabetes*, 2014, 63(4): 1270-1282.
- [19] Li Y, Chen C, Ma Y, et al. Multi-system reproductive metabolic disorder: significance for the pathogenesis and therapy of polycystic ovary syndrome (PCOS)[J]. *Life Sci*, 2019, 228: 167-175.
- [20] Shafiee MN, Seedhouse C, Mongan N, et al. Up-regulation of genes involved in the insulin signalling pathway (IGF1, PTEN and IGFBP1) in the endometrium may link polycystic ovarian syndrome and endometrial cancer[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2016, 424: 94-101.
- [21] McNeilly AS, Duncan WC. Rodent models of polycystic ovary syndrome[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2013, 373(1/2): 2-7.
- [22] Song X, Shen Q, Fan L, et al. Dehydroepiandrosterone-induced activation of mTORC1 and inhibition of autophagy contribute to skeletal muscle insulin resistance in a mouse model of polycystic ovary syndrome[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(15): 11905-11921.
- [23] Azziz R, Carmina E, Chen Z, et al. Polycystic ovary syndrome[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2016, 2: 16057.
- [24] Ly LP, Handelsman DJ. Empirical estimation of free testosterone from testosterone and sex hormone-binding globulin immunoassays[J]. *Eur J Endocrinol*, 2005, 152(3): 471-478.
- [25] Cho LW, Kilpatrick ES, Jayagopal V, et al. Biological variation of total testosterone, free androgen index and bioavailable testosterone in polycystic ovarian syndrome: implications for identifying hyperandrogenaemia[J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2008, 68(3): 390-394.
- [26] Liu Y, Wang Y, Wang F, et al. Mechanism underlying the retarded nuclear translocation of androgen receptor splice variants[J]. *Sci China Life Sci*, 2019, 62(2): 257-267.
- [27] Jagla M, Fève M, Kessler P, et al. A splicing variant of the androgen receptor detected in a metastatic prostate cancer exhibits exclusively cytoplasmic actions[J]. *Endocrinology*, 2007, 148(9): 4334-4343.

[ 收稿日期 ] 2019-05-05

[ 本文编辑 ] 邢宇洋

