

金雀异黄素通过脂联素和 RBP4 途径调节 PCOS-IR 大鼠的胰岛素抵抗作用

杨琪¹, 董佳萍¹, 谢琳琳¹, 王鹤霖¹, 刘殊凡¹, 迟晓星^{1,2*}

(1. 黑龙江八一农垦大学食品学院, 黑龙江大庆 163319) (2. 黑龙江八一农垦大学国家杂粮工程技术研究中心, 黑龙江省农产品加工工程技术研究中心, 黑龙江大庆 163319)

摘要: 为了研究金雀异黄素 (Genistein, Gen) 通过脂联素 (Adiponectin, APN) 和视黄醇结合蛋白-4 (Retinol Binding Protein 4, RBP4) 途径调节多囊卵巢综合征并发胰岛素抵抗 (Polycystic Ovary Syndrome-Insulin Resistance, PCOS-IR) 大鼠的胰岛素抵抗作用。通过皮下注射脱氢表雄酮 (Dehydroepiandrosterone, DHEA) 和人绒毛膜促性腺激素 (Human Chorionic Gonadotropin, HCG) 结合高脂饲料的方法, 建立 PCOS-IR 大鼠模型。大鼠根据体质量随机分为对照组、模型组、Gen-低、中、高剂量组和二甲双胍组, 每组 8 只, 连续干预 21 d, 测定大鼠空腹血糖 (Fasting Blood Glucose, FBG)、胰岛素 (Fasting Insulin, Fins)、APN、RBP4 相关指标水平, 检测卵巢组织内 APN 和 RBP4 相关基因和蛋白的表达。结果发现, 与模型组相比, Gen-中剂量组空腹血糖值显著降低 13.95%, Gen-中、高剂量组空腹胰岛素分别降低 45.80%、51.80%, Gen-高剂量组胰岛素抵抗指数显著降低 57.20%; 与模型组比较, Gen-中剂量大鼠血清 APN、APPL1 水平分别显著提升 69.43%、36.57%, Gen-高剂量组 RBP4 水平显著降低 59.01%, Gen-中剂量组 PEPCK 水平显著下降 22.63%; Gen-中、高剂量组卵巢组织 APPL1、AMPK、p-AMPK 的基因和蛋白表达水平显著提高, RBP4、PEPCK 的基因和蛋白表达水平显著降低。研究表明, 中、高剂量 (20、30 mg/kg) Gen 可通过脂联素和 RBP4 途径有效改善 PCOS-IR 大鼠的糖代谢和胰岛素抵抗。

关键词: 金雀异黄素; 多囊卵巢综合征; 胰岛素抵抗; 脂联素; 视黄醇结合蛋白-4

文章编号: 1673-9078(2022)09-1-9

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.9.1245

Effects of Genistein on PCOS-IR Rats through Adiponectin and RBP4 Pathways

YANG Qi¹, DONG Jiaping¹, XIE Linlin¹, WANG Helin¹, LIU Shufan¹, CHI Xiaoxing^{1,2*}

(1. Heilongjiang Bayi Agricultural University, College of Food Science, Daqing 163319, China)

(2. Coarse Cereals Engineering Research Center, Key Laboratory of Agro-Products Processing and Quality Safety of Heilongjiang Province, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

Abstract: A rat model of polycystic ovary syndrome with insulin resistance (PCOS-IR) was established by administering subcutaneous injections of dehydroepiandrosterone (DHEA) and human chorionic gonadotropin (HCG) and a high-fat diet to study the effects of genistein (Gen) on insulin resistance through adiponectin (APN) and retinol binding protein-4 (RBP4) pathways. Rats were randomly divided into the control group, model group, low-, medium-, and high-dose Gen treatment groups, and metformin treatment group according to their body weights. Each group had eight rats. After 21

引文格式:

杨琪,董佳萍,谢琳琳,等.金雀异黄素通过脂联素和 RBP4 途径调节 PCOS-IR 大鼠的胰岛素抵抗作用[J].现代食品科技,2022,38(9):

1-9

YANG Qi, DONG Jiaping, XIE Linlin, et al. Effects of genistein on PCOS-IR rats through adiponectin and RBP4 pathways [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(9): 1-9

收稿日期: 2021-11-06

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81673170); 黑龙江省科技厅自然科学基金研究团队项目 (TD2020C003); 国家重点研发计划项目 (2018YFE0206300); 黑龙江省自然科学基金项目 (LH2021H055)

作者简介: 杨琪 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品营养与安全, E-mail: 1078146387@qq.com

通讯作者: 迟晓星 (1976-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品营养与安全, E-mail: chixiaoxing@sina.com

days of continuous treatment, the levels of Fasting Blood Glucose (FBG), Fasting insulin (Fins), APN, and RBP4 were measured, and the expression of APN- and RBP4-related genes and proteins in the ovarian tissue was analyzed. The results showed that in comparison with the model group, the medium-dose Gen treatment group had a significantly decrease of 13.95% in the FBG. Fins levels of the medium- and high-dose Gen treatment groups decreased by 45.80% and 51.80%, respectively, as compared to the level in the model group. The insulin resistance index of the high-dose group significantly reduced by 57.20%. Serum APN and Adaptor protein, phosphotyrosine interacting with PH domain and leucine zipper 1 (APPL1) levels of the medium-dose group were significantly higher by 69.43% and 36.57%, respectively, and RBP4 level of the high-dose group was significantly lower by 59.01% than those in the model group. The level of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) of the medium-dose group remarkably reduced by 22.63%. The gene and protein expression levels of APPL1, AMP-activated protein kinase (AMPK), and p-AMPK in the ovarian tissue of the medium- and high-dose groups considerably increased, but those of RBP4 and PEPCK significantly decreased. Thus, medium and high doses (20 and 30 mg/kg) of Gen can effectively improve glucose metabolism and insulin resistance in PCOS-IR rats through adiponectin and RBP4 pathways.

Key words: genistein; polycystic ovary syndrome; insulin resistance; adiponectin; Retinol Binding Protein 4 (RBP4)

多囊卵巢综合征 (Polycysticovarysyndrome, PCOS) 是一种异质性综合征^[1,2], 是生育期女性最常见的内分泌代谢紊乱。胰岛素抵抗 (Insulin Resistance, IR) 是指细胞、组织和器官等对胰岛素的敏感性下降, 对葡萄糖的吸收代谢能力降低, 代偿性的刺激胰岛 β 细胞分泌更多的胰岛素以维持体内葡萄糖水平, 它与心血管疾病、糖尿病和代谢综合征有密切关系。研究发现 50%~70% 的 PCOS 患者存在胰岛素抵抗现象, 而且其中有 40% 以上会发展成为葡萄糖耐受紊乱甚至会发展成 II 型糖尿病^[3], 但是目前胰岛素抵抗发生的具体过程和确切机制仍不完全清楚。最近发现许多因子如脂联素 (Adiponectin, APN)、内脂素等, 与 PCOS 的病理和 IR 的发生紧密相关, 还有一些蛋白质如抵抗素、视黄醇结合蛋白-4 (Retinol-Binding Protein 4, RBP4), 已经成为评价 PCOS-IR 的新标记物, 但是它们的具体作用机制仍然存在争议, 其中 APN 和 RBP4 是影响 PCOS 女性代谢紊乱的最主要因子^[4,5]。脂联素在哺乳动物体内是一种来源于脂肪的因子^[6], 在体内以多聚体形式存在, 包含低、中、高分子量脂联素 (HMW)^[7], 其可以通过增强棕色脂肪的活性, 来改善胰岛素抵抗从而参与调控 PCOS^[8,9]。研究^[10]发现, 脂联素也可以通过调控糖脂代谢参与代谢过程, 发挥有益作用。最近研究^[11,12]发现 RBP4 也是由脂肪细胞分泌的一种蛋白质, RBP4 水平的升高已经被证明与啮齿类动物的肥胖和胰岛素抵抗相关, 但是具体的生理功能尚未完全明确。APN 与 RBP4 这两种脂肪细胞因子间存在何种关系, 目前研究尚少。

金雀异黄酮 (Genistein, Gen) 是大豆异黄酮的主要活性成分, 其分子结构与人体自身雌激素相同。Gen 进入身体后, 可与雌激素受体结合, 进而发挥雌激素的作用, 所以 Gen 被认为是雌激素的天然替代品。相关文献^[13,14]报道大豆异黄酮 (包括 Gen 和大豆黄素) 可改善高糖血症与高胰岛素血症, 具有抗氧化、抗炎、

改善血糖血脂等多种生理功能^[15,16]。目前, 金雀异黄酮对多囊卵巢综合征并发胰岛素抵抗大鼠胰岛素抵抗改善作用的报道较少。因此, 本实验研究金雀异黄酮对脱氢表雄酮 (Dehydroepiandrosterone, DHEA) 和人绒毛膜促性腺激素 (Human Chorionic Gonadotropin, HCG) 结合高脂饲料诱导建立的 PCOS-IR 大鼠胰岛素抵抗的改善作用, 并研究其具体调节机制, 旨在为 PCOS-IR 的发病机制研究提供新思路, 为治疗提供新的药物靶点。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

金雀异黄酮 (纯度 99.99%), 上海融合有限公司; 去氢表雄酮、二甲双胍, 上海麦克林生化科技有限公司; 注射用大豆油, 浙江山雨田有限公司; 人绒毛膜促性腺激素, 深圳海思安生物技术有限公司; 花生油, 山东鲁花集团有限公司; HE 染液, 南京建成生物技术有限公司; 胰岛素 (Insulin, INS)、APN、含 pH 域衔接因子蛋白 (Adaptor Protein, Phosphotyrosine Interaction, PH Domain and Leucine Zipper Containing 1, APPL1)、RBP4、磷酸烯醇丙酮酸羧基激酶 (Phosphoenolpyruvate Carboxykinase, PEPCK)、检测试剂盒, 南京建成生物工程研究所; 动物组织总 RNA 提取试剂盒、反转录试剂、实时定量 PCR 试剂, 碧云天生物技术有限公司; 引物由上海生工生物工程有限公司合成; APPL1 抗体、RBP4 抗体、PEPCK 抗体、AMP 依赖蛋白激酶 (AMP-Activated Protein Kinase, AMPK) 抗体、磷酸化 AMP 依赖蛋白激酶 (p-AMP-Activated Protein Kinase, p-AMPK) 抗体, β -actin 抗体, 正能生物有限公司。

SPF 级 22 日龄雌性 SD 大鼠 (体质量 180~220 g), 购买于辽宁长生生物技术股份有限公司, 许可证号:

SCXK (辽) 2020-0001。高脂饲料由黑龙江八一农垦大学食品学院自制, 质量分数为: 78.8%普通饲料、10.0%猪油、10.0%蛋黄粉、0.2%胆酸钠、1.0%胆固醇; 配料购自河南万邦化工科技有限公司。本实验遵循黑龙江八一农垦大学动物伦理委员会原则。

1.2 仪器与设备

GA3 型血糖仪, 三诺生物传感股份有限公司; 酶标仪, 中国 Mindray 迈瑞医疗公司; 实时荧光定量 PCR 仪、PCR 扩增仪、ChemiDoc XRS+化学发光成像系统, 美国 Bio-Rad 公司。

1.3 方法

1.3.1 造模方法

参考 Wang 等^[17]确立 PCOS-IR 大鼠模型方法: 60 只 22 日龄雌性 Sprague Dawley (SD) 大鼠按体质量随机分为对照组 (10 只) 和 PCOS-IR 造模组 (50 只), 造模组大鼠每日皮下注射 DHEA 6 mg/100 g (以体质量为基准计) 和 0.2 mL 注射用大豆油, 腹部皮下注射 1.5 U HCG, 每日一次, 共 42 d。同时, 模型组的大鼠喂饲高脂饲料, 诱导 PCOS-IR 模型。对照组大鼠皮下注射相同体积的注射用油、生理盐水和正常饮食。给药并高脂饮食后的第 33 天开始, 大鼠阴道涂片确立 PCOS 模型的建立, 通过阴道涂片检查显示 PCOS 大鼠没有性周期(即一直处于动情间期), 表明没有排卵。第 42 天, 大鼠尾部取血测定空腹血糖值和胰岛素抵抗的稳态模型评估 (HOMA-IR) 指数进行计算。HOMA-IR \geq 1.66 用于确定 IR 大鼠的依据。

1.3.2 分组及给药

60 只 22 日龄雌性 SD 大鼠按质量随机分为对照组 (10 只) 和 PCOS-IR 造模组 (50 只), 造模成功的大鼠分成模型组、Gen-低、中、高剂量组、二甲双胍组, 每组 8 只。造模结束后, 对照组和模型组不加 Gen 治疗, 给予等体积花生油; 各 Gen 剂量组分别给予 Gen (溶于花生油) 10、20、30 mg/(kg·d), 阳性对照组给予二甲双胍 200 mg/(kg·d), 每日一次, 连续 21 d。

1.3.3 指标检测

1.3.3.1 大鼠阴道涂片方法

将待检测大鼠放到操作台上, 清理身上垫料杂物, 安抚至大鼠情绪稳定不反抗, 用拇指和食指捏住尾巴, 其余三指轻轻压住后腰和背部, 然后翻起尾巴露出阴道口, 将粪便清理干净, 用蘸有少量生理盐水的棉签在大鼠阴轻轻道涂抹数次, 涂片^[18], 并用 HE 染液染色, 显微镜观察。

1.3.3.2 血清指标测定

末次给药后, 禁食禁水 12 h, 血糖仪测定大鼠空腹血糖值, 试验结束后用乙醚对大鼠进行麻醉, 腹主动脉取血, 室温静置, 以 2000 r/min 离心 10 min, 取血清, ELISA 法检测各组血清 INS、APN、APPL1、PEPCK、RBP4 表达水平。

1.3.3.3 RT-PCR 检测卵巢组织内 mRNA 检测

按照动物组织 RNA 提取试剂盒说明书提取大鼠卵巢中 RNA, 测定 RNA 浓度, 按照反转录试剂盒说明书将 RNA 反转录为 cDNA, 再以 cDNA 为模板进行荧光定量 PCR 分析。引物序列见表 1。

1.3.3.4 Western blot 检测卵巢组织内蛋白检测

各组大鼠卵巢组织按照每 30 mg 组织样本加入 250 μ L 体积的 NP-40 裂解液, 裂解 30 min, 每间隔 10 min 涡旋振荡 10 s 使裂解更充分; 裂解完成后, 12 000 r/min 离心 10 min, 然后取上清液, BCA 法测定蛋白浓度。配制凝胶及电泳液, 电泳后转膜至 PVDF 膜, 5%脱脂奶粉封闭 1 h, 加入 APPL1、RBP4、PEPCK、AMPK、p-AMPK 一抗 (均按 1:500 稀释), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗涤 5 次, 加入相应二抗 (1:1 000), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, TBST 洗涤 5 次, 滴加 ECL 化学发光液显影, 凝胶成像系统进行分析, 计算目的蛋白相对表达量。

1.4 数据统计分析

实验数据采用 SPSS 22.0 分析, 结果均以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 组间比较采用 ANOVA 单因素分析, $p\leq 0.05$ 为差异性显著, $p\leq 0.01$ 为差异性极显著。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因名称	上游引物	下游引物
APPL1	AGAGACCCTGGAGGACAGTCCG	AGGTGTGTTGCTGCACTCAATTCAT
RBP4	GACAAGGCTCGTTTCTCTGG	AAAGGAGGCTACACCCCAGT
PEPCK	GACAGACTCGCCCTATGTGGTG	GGTTCAGGCCAGTTGTTG
AMPK	AAACCCACAGAAATCCAAACAC	CCTTCCATTCATAGTCCAACCTG
GAPDH	GGTATCGTGGAAGGACTCATGAC	ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC

2 结果与分析

2.1 建模情况分析

2.1.1 造模后大鼠动情周期

大鼠动情周期观察如图 1 所示,动情前期(图 1a),相当于人体月经周期的卵泡早期,此期主要存在膨大椭圆、有核的上皮细胞,也有少量角化细胞或白细胞;动情期(图 1b)相当于人体月经周期的排卵期,多见大量不规则、无核角化鳞状上皮细胞,呈树叶堆积状;动情后期(图 1c)相当于人体月经周期的黄体期,会有白细胞、角化细胞和有核上皮细胞三种细胞形态,且三种细胞数量相当;动情间期(图 1d)相当于人体月经周期的黄体后期,以白细胞为主,也可见少量上皮细胞。造模后,和对照组大鼠相比,PCOS 大鼠连续处于动情间期(图 1d) 10 d,表明没有排卵,动情周期紊乱,而且 PCOS 大鼠形态肥胖,毛发浓密、体质量明显增加。上述结果表明 PCOS 大鼠建模成功。

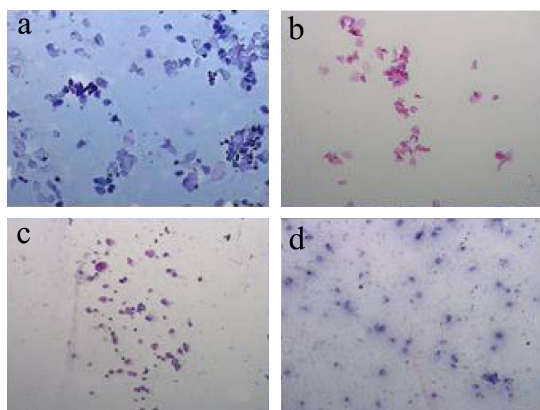


图 1 大鼠动情期

Fig.1 Estrous period of rats

2.1.2 造模后各组大鼠胰岛素抵抗指数

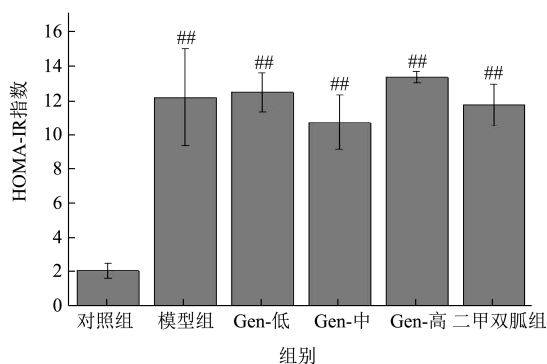


图 2 造模后各组大鼠胰岛素抵抗指数

Fig.2 Insulin resistance index of rats in each group

注: ##各组与对照组比较 ($p<0.01$)。

造模后各组大鼠胰岛素抵抗指数如图 2 所示,除对照组外,其余组别 $HOMA-IR \geq 1.66$;与对照组相比,

Gen-高剂量组 HOMA-IR 指数升高 5.45 倍,表明胰岛素抵抗大鼠模型建立成功。

2.2 Gen 对大鼠生化指标的影响

2.2.1 Gen 对大鼠体质量的影响

灌胃期间各组大鼠体质量变化如图所示,第 7 天各组大鼠体质量与第 0 天相比变化都为上升趋势,其中对照组和模型组体质量增长 20~25 g,其他剂量组 and 二甲双胍组增加量较小;到第 14 天,对照组和模型组仍然处于上升趋势,但各剂量组和二甲双胍组有下降趋势,其中 Gen-低剂量组下降 25 g;经过 21 d 灌胃后,模型组体质量显著高于对照组 62.17 g,与模型组相比,各剂量组体质量显著降低,其中 Gen-低、中剂量组分别降低 14.72%和 12.51%。实验结果表明,Gen 可有效减轻 PCOS 大鼠体质量。

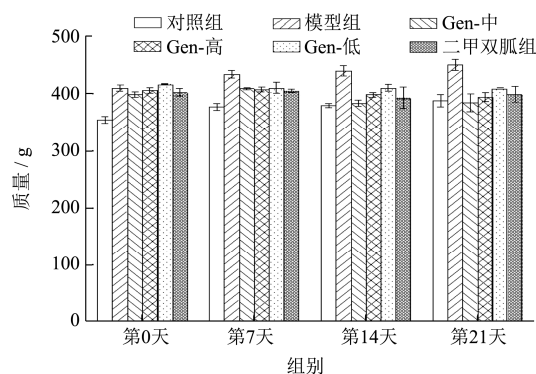


图 3 灌胃期间各组大鼠体质量

Fig.3 Body weight of rats in each group during gavage

2.2.2 Gen 对大鼠血糖指标的影响

表 2 各组大鼠空腹血糖、胰岛素及胰岛素抵抗指数

Table 2 FBG, Fins and HOMA-IR of rats in each group

组别	生化指标		
	FBG 浓度 (mmol/L)	Fins 含量 (mIU/L)	HOMA-IR 指数
对照组	3.77±0.12**	20.16±4.32**	3.37±0.13**
模型组	4.73±0.15	59.46±2.87	12.50±0.82
Gen-低组	4.17±0.21*	35.45±2.82**	6.57±0.12**
Gen-中组	4.07±0.15*	32.23±1.46**	5.83±0.57**
Gen-高组	4.20±0.26*	28.66±1.10**	5.35±0.49**
二甲双胍组	4.10±0.44*	28.87±1.70**	5.26±0.86**

注: *各组与模型组比较 ($p<0.05$), **各组与模型组比较 ($p<0.01$)。下表同。

各由表 2 可知,与对照组相比,模型组大鼠血清中 FBG 显著上升 25.46% ($p<0.01$), Fins 含量和 HOMA-IR 指数分别显著增加 1.95 倍和 2.71 倍 ($p<0.01$), 经过 Gen 灌胃 21 d 后各剂量组血糖值比模型组显著下降 ($p<0.05$), 其中 Gen-中剂量组降

低了 13.95% ($p < 0.05$)；Gen 各剂量组空腹胰岛素与模型组相比有所下降，其中 Gen-中、高剂量组分别降低 45.80%、51.80% ($p < 0.01$)；与模型组相比，Gen 各剂量组胰岛素抵抗指数显著下降 ($p < 0.01$)，其中 Gen-高剂量组降低了 57.20%。文献^[19,20]报道，大豆异黄酮可有效防止糖尿病大鼠的氧化应激反应。Jayagopal 等^[21]给 32 例 II 型糖尿病绝经后妇女饮食中添加 12 周植物雌激素（异黄酮 132 mg/d），也发现植物雌激素可显著降低空腹血糖、空腹胰岛素水平，改善 IR。本实验结果也证实不同剂量 Gen 可以降低 PCOS-IR 大鼠的空腹血糖值、空腹胰岛素及胰岛素抵抗指数。

2.3 Gen 对大鼠血清 APN、RBP4 及相关指标的影响

各组大鼠血清中 APN、APPL1、RBP4 和 PEPCK 含量如表 3 所示。与对照组相比，模型组中脂联素、APPL1 含量分别显著下降 48.73% ($p < 0.01$)、27.86% ($p < 0.05$)，Gen 灌胃 21 d 后，与模型组比较，Gen 低、中、高剂量组中 APN、APPL1 含量有不同程度的提高 ($p < 0.05$)，其中 Gen-中剂量显著增加 APN 含

量 69.43% ($p < 0.05$)、显著增加 APPL1 含量 36.57% ($p < 0.05$)，且改善效果与二甲双胍组相当。脂联素是一种具有胰岛素增敏、抗动脉粥样硬化作用的脂肪因子，它可以通过与脂联素受体 1 (AdipoR1) 和 AdipoR2 的相互作用进而调节卵巢功能^[22-24]。含有 PH 结构域、PTB 结构域和亮氨酸拉链基序 1 (APPL1) 的接头蛋白是介导脂联素和胰岛素信号通路所必需的接头信号蛋白。APPL1 在胰岛素和脂联素的几个靶组织，包括肝脏、骨骼肌、内皮、白色脂肪组织和胰岛中广泛表达^[25]。研究^[26]发现 PCOS 患者体内血清脂联素水平与胰岛素抵抗之间存在显著的负相关，而且体质指数 (BMI) 和脂联素之间无相关性，这表示胰岛素敏感性可能是脂联素水平的主要决定因素，而不是肥胖。Panidis 等^[27]研究发现 PCOS 患者血清中脂联素水平低于正常人群。Yildiz 等^[28]也有类似的发现，他们证明了胰岛素抵抗增加与脂联素水平降低之间的关系，证实脂联素可能是 IR 和由 IR 导致的糖尿病和代谢综合征的一个合适的标志物。本实验的研究结果与上述结果一致，模型组大鼠血清中的脂联素显著低于对照组，与脂联素变化趋势一致，APPL1 含量显著低于对照组，经过 Gen 灌胃后有所改善。

表 3 各组大鼠血清中 APN、APPL1、RBP4 和 PEPCK 水平

Table 3 APN, APPL1, RBP4 and PEPCK levels of rats in each group

分组	血清指标			
	APN 质量浓度/(mg/L)	APPL1 质量浓度/(ng/L)	RBP4 质量浓度/(ng/mL)	PEPCK 质量浓度/(ng/mL)
对照组	73.50±5.87**	580.25±76.80*	15.84±1.00*	10.65±0.81*
模型组	37.68±6.69	418.62±52.92	25.95±4.46	13.92±3.18
Gen-低组	54.92±9.43*	563.46±48.52*	19.98±4.98*	11.34±0.99*
Gen-中组	63.84±12.11*	571.73±23.94*	17.16±1.44*	10.77±0.38*
Gen-高组	61.50±11.17*	532.14±25.75*	16.23±0.52*	10.87±0.56*
二甲双胍组	56.74±4.73*	592.40±29.96	16.69±1.66*	11.42±1.10*

与对照组相比，模型组中 RBP4、PEPCK 含量显著上升 63.83%、30.70% ($p < 0.05$)，Gen 灌胃 21 d 后，与模型组相比，Gen-低、中、高剂量组中 RBP4、PEPCK 含量有不同程度降低 ($p < 0.05$)，其中 Gen-高剂量组 RBP4 含量显著下降 59.01% ($p < 0.05$)，Gen-中剂量组显著 PEPCK 含量显著下降 22.63% ($p < 0.05$)。视黄醇结合蛋白 4 (RBP4) 是一种与肥胖及 II 型糖尿病的胰岛素抵抗有关的脂肪因子^[29]。在肝脏中直接通过 PEPCK 途径对肝脏糖代谢产生影响^[30]，抑制胰岛素信号的表达，改善胰岛素抵抗。Li 等^[31]发现 PCOS 患者的 RBP4 水平与胰岛素敏感性呈正相关，该蛋白是脂肪组织与胰岛素抵抗之间的重要蛋白。本实验的实验结果证实了上述研究内容，模型对照组的 RBP4 水平

高于正常对照组，经过金雀异黄素灌胃后，各剂量组 RBP4、PEPCK 含量降低。

2.4 APN、RBP4、Fins 含量和 HOMA-IR 指数相关性分析

Pearson 法分析显示，PCOS 大鼠血清脂联素含量与 HOMA-IR 呈负相关 ($p < 0.01$)，与 Fins 含量呈负相关 ($p < 0.05$) RBP4 含量与 HOMA-IR、Fins 含量呈正相关 ($p < 0.01$)，结果见表 4。在多种遗传和饮食诱导的 IR 小鼠模型中，血清 RBP4 含量均显著升高，此后临床研究发现血清 RBP4 与 IR 正相关^[32]，故认为 RBP4 是一种参与 IR 发生的脂肪细胞因子^[33]。而脂

联素是目前发现的唯一对人体有保护作用的脂肪细胞因子,具有改善 IR、改善糖代谢的作用。Shin 等^[34]报道血清 RBP4 与脂联素呈显著负相关,且多元逐步回归分析显示降低的血清脂联素含量是 RBP4 的独立相关因素。结果表明,PCOS-IR 大鼠血清 RBP4 含量明显升高且与 IR 呈正相关,脂联素含量明显降低且与 IR 呈负相关,两种脂肪细胞因子在 IR 及糖代谢方面作用相反。

表 4 脂联素、RBP4 和胰岛素含量、胰岛素抵抗指数相关性

Table 4 Correlation of adiponectin, RBP4 and Fins, insulin resistance index

指标	脂联素		RBP4	
	R 值	P 值	R 值	P 值
HOMA-IR	-0.966**	0.002	0.945**	0.004
Fins	-0.908*	0.012	0.975**	0.001

2.5 Gen 对 PCOS-IR 大鼠卵巢组织相关 mRNA 和蛋白相对表达量的影响

各组大鼠卵巢组织中 mRNA 相对表达量如图 4 所示,模型组中 *APPL1*、*AMPK* 相对表达量显著低于对照组 ($p < 0.01$ 、 $p < 0.01$), Gen 灌胃 21 d 后, Gen-低、中、高剂量组均可显著提高 *APPL1*、*AMPK* 含量 ($p < 0.01$); 与对照组相比模型组中 *RBP4*、*PEPCK*

含量显著上升 ($p < 0.01$)。与模型组相比, Gen 低、中、高剂量组中 *RBP4*、*PEPCK* 含量有不同程度降低 ($p < 0.01$)。

各组大鼠卵巢组织中 *APPL1*、*RBP4*、*PEPCK*、*AMPK*、*P-AMPK* 蛋白相对表达量如图 5 所示,模型组中 *APPL1*、*AMPK*、*P-AMPK* 相对表达量显著低于对照组 ($p < 0.01$), Gen 灌胃 21 d 后, Gen-低、中、高剂量组均可显著提高 *APPL1*、*AMPK*、*P-AMPK* 水平 ($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$); 与对照组相比,模型组中 *RBP4*、*PEPCK* 水平显著上升 ($p < 0.01$), 与模型组相比, Gen-低、中、高剂量组中 *RBP4*、*PEPCK* 水平有不同程度降低 ($p < 0.01$), Gen-中、高剂量组和二甲双胍组有着相似的治疗效果。

研究表明 *RBP4* 能够诱导 *PEPCK* 的表达量水平上升,另有文献显示脂联素能直接使 *PEPCK* 的表达下降^[35]。研究发现,脂联素增加胰岛素敏感性,改善胰岛素抵抗,机制可能是通过由含 pH 域衔接因子蛋白 (*APPL1*) 介导的脂联素信号转导通路,其可与脂联素受体相结合,进而激活 AMP 依赖蛋白激酶 (*AMPK*) 通路调糖代谢^[36]。基于以上研究结果,本实验表明, Gen 可以提高 PCOS-IR 大鼠卵巢组织中 *APPL1* mRNA 和蛋白表达,降低 *RBP4*、*PEPCK* mRNA 和蛋白表达,激活 *AMPK* 通路,改善 PCOS-IR 大鼠空腹血糖、胰岛素抵抗现象。

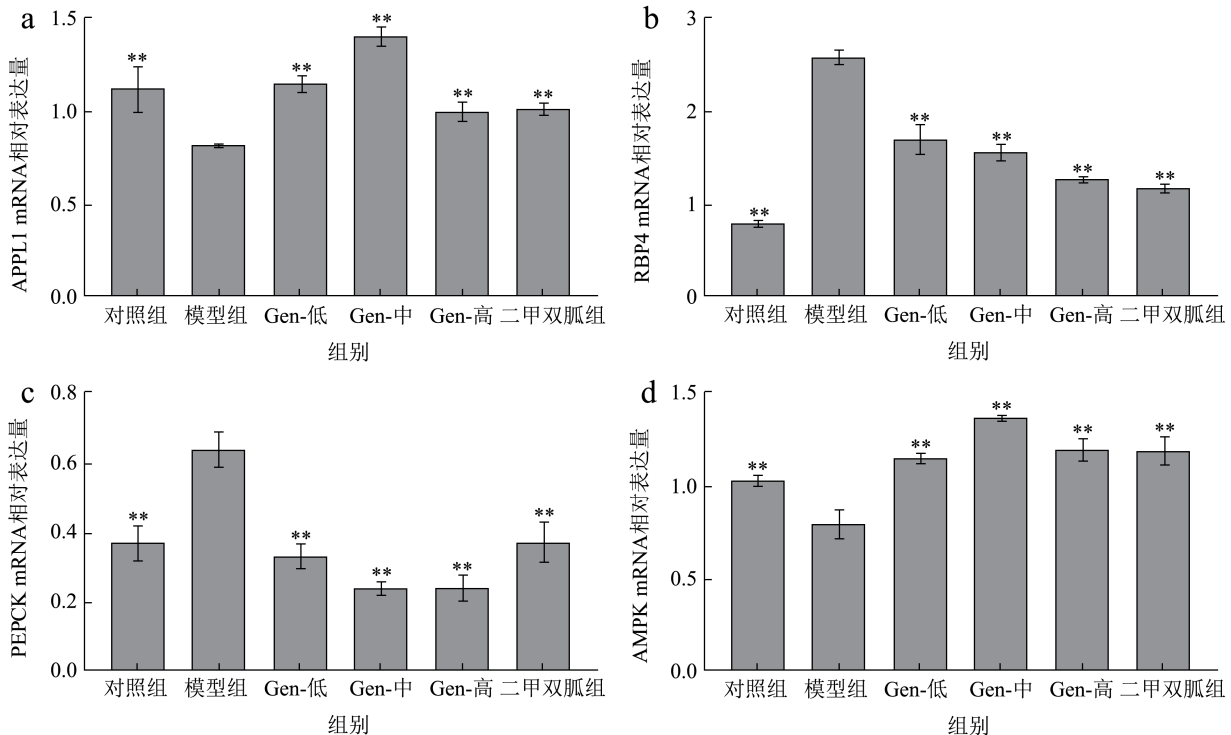


图 4 卵巢组织 *APPL1* (a)、*RBP4* (b)、*PEPCK* (c)、*AMPK* (d) mRNA 相对表达量

Fig.4 Relative mRNA expression of *APPL1* (a), *RBP4* (b), *PEPCK* (c), *AMPK* (d) in ovarian

注: *各组与模型组比较 ($p < 0.05$), **各组与模型组比较 ($p < 0.01$). 下图同。

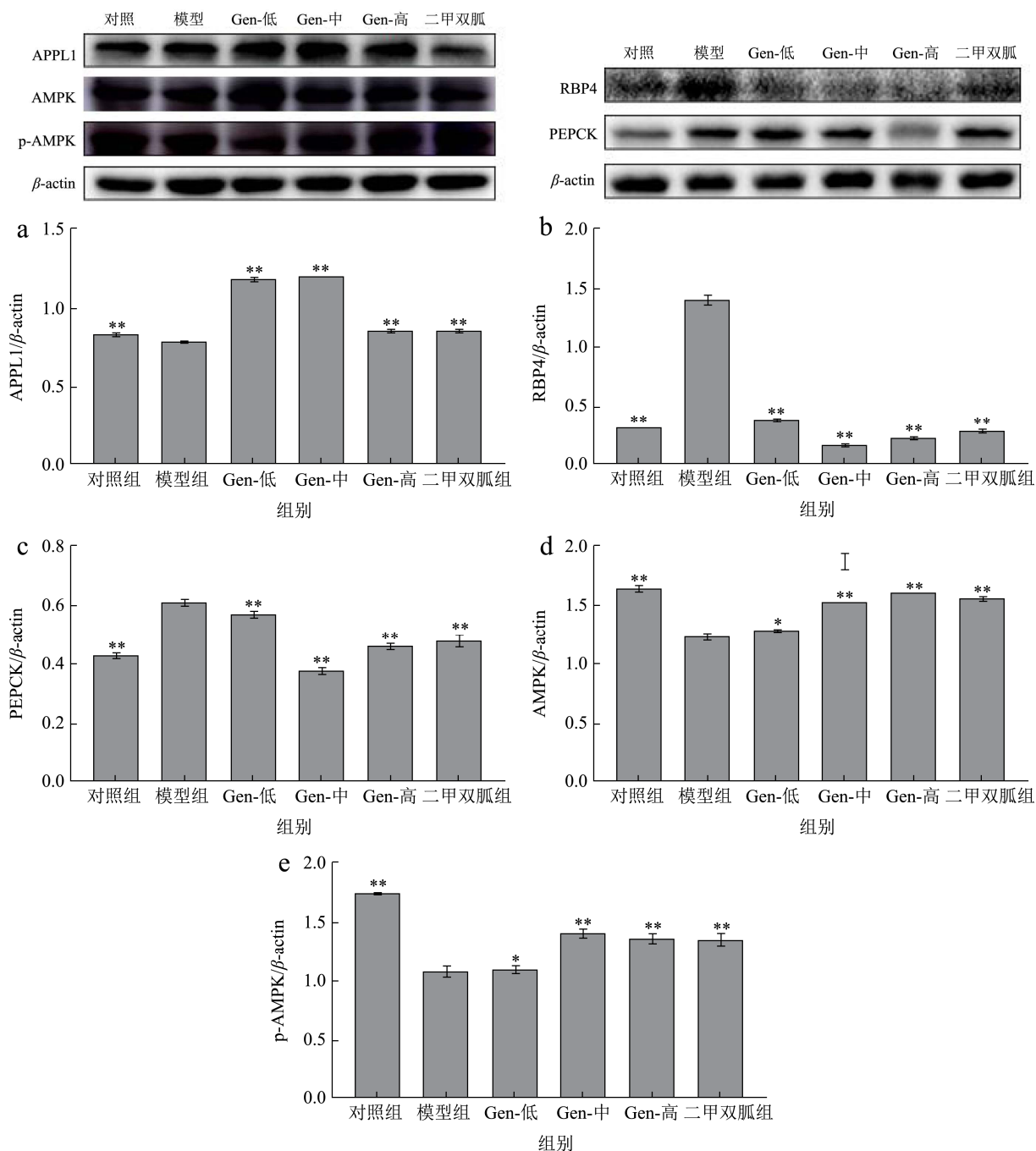


图5 卵巢组织 APPL1 (a)、RBP4 (b)、PEPCK (c)、AMPK (d)、P-AMPK (e) 蛋白相对表达量

Fig.5 Relative protein expression of APPL1 (a), RBP4 (b), PEPCK (c), AMPK (d), P-AMPK (e) in ovarian

3 结论

本研究结果表明,金雀异黄素对 PCOS-IR 大鼠糖代谢具有显著的调节作用,具体表现为降低大鼠血糖、胰岛素水平和胰岛素抵抗指数。此外,金雀异黄素可显著增加 PCOS-IR 大鼠血清中脂联素、APPL1 含量,降低血清中 RBP4、PEPCK 含量,激活 AMPK 通路抑制 PCOS-IR 的胰岛素抵抗指数,改善糖代谢紊乱症状。综上,金雀异黄素具有调节 PCOS-IR 大鼠胰岛素抵抗的作用,该结论为金雀异黄素相关保健食品的开

发和临床应用提供了一定的理论依据。

参考文献

- [1] Azziz R. Polycystic ovary syndrome [J]. *Obstetrics & Gynecology*, 2018, 132: 321-336
- [2] Héctor F E M. Polycystic ovary syndrome: definition, aetiology, diagnosis and treatment [J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2018, 14(Suppl. 1):270-284
- [3] Kakoly N S, Khomami M B, Joham A E, et al. Ethnicity, obesity and the prevalence of impaired glucose tolerance and

- type 2 diabetes in PCOS: a systematic review and meta-regression [J]. *Human Reproduction Update*, 2018, 4: 455-467
- [4] K Polak, A Czyzyk, T Simoncini, et al. New markers of insulin resistance in polycystic ovary syndrome [J]. *Journal of Endocrinological Investigation*, 2017,40(1): 1-8
- [5] Tabak Omur, Simsek Gonul, Erdenen Fusun, et al. The relationship between circulating irisin, retinol binding protein-4, adiponectin and inflammatory mediators in patients with metabolic syndrome [J]. *Archives of Endocrinology and Metabolism*, 2017, 61(6): 515-523
- [6] Wang R, Kuang M, Nie H, et al. Impact of food restriction on the expression of the adiponectin system and genes in the hypothalamic-pituitary-ovarian axis of pre-pubertal ewes [J]. *Reproduction in Domestic Animals*, 2016, 51(5): 657-664
- [7] Acharya Sushama D, Evans Rhobert W, Brooks Maria M, et al. Total and high-molecular-weight adiponectin levels in relation to insulin resistance among overweight/obese adults [J]. *Central Asian Journal of Global Health*, 2013, 2(2):55
- [8] Baldani Dinka Pavičić, Skrgatic Lana, Kasum Miro, et al. Altered leptin, adiponectin, resistin and ghrelin secretion may represent an intrinsic polycystic ovary syndrome abnormality [J]. *Gynecological Endocrinology: the Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 2019, 35(5): 401-405
- [9] Ruan Hong, Dong Lily Q. Adiponectin signaling and function in insulin target tissues [J]. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2016, 8(2): 101-109
- [10] Anna Benrick, Belén Chancléon, Peter Micallef, et al. Adiponectin protects against development of metabolic disturbances in a PCOS mouse model [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017, 114(34): 7187-7196
- [11] Park Se Eun, Park Cheol-Young, Sweeney Gary. Biomarkers of insulin sensitivity and insulin resistance: past, present and future [J]. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 2015, 52(4): 180-190
- [12] Majerczyk Marcin, Olszanecka-Glinianowicz Magdalena, Puzianowska-Kuźnicka Monika, et al. Retinol-binding protein 4 (RBP4) as the causative factor and marker of vascular injury related to insulin resistance [J]. *Postępy Higieny i Medycyny Doswiadczałnej (Online)*, 2016, 70: 1267-1275
- [13] Guannan Huang, Joella Xu, Daniel E Lefever, et al. Genistein prevention of hyperglycemia and improvement of glucose tolerance in adult non-obese diabetic mice are associated with alterations of gut microbiome and immune homeostasis [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2017, 332: 138-148
- [14] Ming Jin, Ming-hua Shen, Mei-hua Jin, et al. Hypoglycemic property of soy isoflavones from hypocotyl in goto-kakizaki diabetic rats [J]. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 2018, 62(2): 148-154
- [15] Md Anisur Rahman Mazumder, Parichat Hongsprabhas. Genistein as antioxidant and antibrowning agents in *in vivo* and *in vitro*: a review [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2016, 82: 379-392
- [16] Ganai A A, Farooqi H. Bioactivity of genistein: a review of *in vitro* and *in vivo* studies [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2015, 76: 30-38
- [17] WANG Lihong, WANG Xu, YU Xizhong, et al. Potent therapeutic effects of Shouwu Jiangqi decoction on polycystic ovary syndrome with insulin resistance in rats [J]. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 2016, 22(2): 116-123
- [18] 张莉,高旭峰,王玉环.多囊卵巢综合征并胰岛素抵抗大鼠高分子脂联素表达及二甲双胍的影响[J].*中国生育健康杂志*,2019,1:72-76,102
ZHANG Li, GAO Xufeng, WANG Yuhuan. Expression of high molecular adiponectin and effect of metformin in rats with polycystic ovary syndrome and insulin resistance [J]. *Chinese Journal of Reproductive Health*, 2019, 1: 72-76, 102
- [19] Lu Mei-Ping, Wang Rui, Song Xiuyuan, et al. Dietary soy isoflavones increase insulin secretion and prevent the development of diabetic cataracts in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Nutr Res*, 2008, 28: 464-471
- [20] Stephenson T J, Setchell K D R, Kendall C W C, et al. Effect of soy protein-rich diet on renal function in young adults with insulin-dependent diabetes mellitus [J]. *Clin Nephrol*, 2005, 64: 1-11
- [21] Jayagopal Vijay, Albertazzi Paula, Kilpatrick Eric S, et al. Beneficial effects of soy phytoestrogen intake in postmenopausal women with type 2 diabetes [J]. *Diabetes Care*, 2002, 25: 1709-1714
- [22] Ezeh Uche, Chen Ida Y-D, Chen Yen-Hao, et al. Adipocyte insulin resistance in PCOS: relationship with GLUT-4 expression and whole-body glucose disposal and β -cell function [J]. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2020, 105(7):2408-2420
- [23] Meryem Kuru Pekcan, Aytekin Tokmak, Hatice Akkaya, et al. Assessment of the relationship between serum high molecular weight adiponectin hormone levels and insulin

- resistance in patients with polycystic ovary syndrome [J]. *Hormone and Metabolic Research*, 2019, 51(4): 261-266
- [24] Shorakae Soulmaz, Abell Sally K, Hiam Danielle S, et al. High-molecular-weight adiponectin is inversely associated with sympathetic activity in polycystic ovary syndrome [J]. *Fertility and Sterility*, 2018, 109(3): 532-539
- [25] Tayebe Artimani, Rezvan Najafi. APPL1 as an important regulator of insulin and adiponectin-signaling pathways in the PCOS: a narrative review [J]. *Cell Biology International*, 2020, 44(8): 1577-1587
- [26] Al-Awadi Amina M, Sarray Sameh, Arekat Mona R, et al. The high-molecular weight multimer form of adiponectin is a useful marker of polycystic ovary syndrome in Bahraini Arab women [J]. *Clinical Nutrition ESPEN*, 2016, 13: e33-e38
- [27] Panidis D, Kourtis A, Kukuvtis A, et al. Association of the T45G polymorphism in exon 2 of the adiponectin gene with polycystic ovary syndrome: role of delta4-androstenedione [J]. *Human Reproduction*, 2004, 19: 1728-1733
- [28] Yildiz Yunus, Ozaksit Gülnur, Serdar Unlu Bekir, et al. Serum adiponectin level and clinical, metabolic, and hormonal markers in patients with polycystic ovary syndrome [J]. *International Journal of Fertility & Sterility*, 2014, 7(4): 331-336
- [29] Magdalena Olszanecka-Glinianowicz, Pawel Madej, Dariusz Zdun, et al. Are plasma levels of visfatin and retinol-binding protein 4 (RBP4) associated with body mass, metabolic and hormonal disturbances in women with polycystic ovary syndrome [J]. *European Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2012, 162(1): 55-61
- [30] De Abreu Virginia Genelhu, Martins Cyro José de Moraes, De Oliveira Patricia Aguiar Cardoso, et al. High-molecular weight adiponectin/HOMA-IR ratio as a biomarker of metabolic syndrome in urban multiethnic Brazilian subjects [J]. *PloS One*, 2017, 12(7): 1-12
- [31] Weiping Li, Qingfeng Cheng, Shikun Ma, et al. Elevated serum RBP4 is associated with insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome [J]. *Endocrine*, 2006, 30: 283-287
- [32] Saucedo Renata, Zarate Arturo, Basurto Lourdes, et al. RBP4 gene variants are associated with insulin resistance in women with previous gestational diabetes [J]. *Dis Markers*, 2014, 2014: 269208
- [33] Gliniak Christy M, Brown J Mark, Noy Noa, et al. The retinol-binding protein receptor STRA6 regulates diurnal insulin responses [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292: 15080-15093
- [34] Shin Min-Jeong, Kang Seok-Min, Jang Yangsoo, et al. Serum retinol binding protein 4 levels are associated with serum adiponectin levels in non-diabetic, non-obese subjects with hypercholesterolemia [J]. *Clin Chim Acta*, 2007, 378: 227-229
- [35] Zhou Heather, Song Xiaomin, Briggs Mike, et al. Adiponectin represses gluconeogenesis independent of insulin in hepatocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 338: 793-799
- [36] Ryu Jiyeon, Galan Amanda K, Xin Xiaoban et al. APPL1 potentiates insulin sensitivity by facilitating the binding of IRS1/2 to the insulin receptor [J]. *Cell Rep*, 2014, 7: 1227-1238