

亚麻籽油对多囊卵巢综合征大鼠 炎症细胞的调节作用

汪婷¹, 李一唯¹, 柳媛媛¹, 禹文文¹, 胡富宁², 罗晓静³, 鲁奕男⁴, 张晓霞^{2*}, 王浩^{1,5*}

(1. 宁夏医科大学基础医学院, 宁夏银川 750004) (2. 宁夏医科大学中医学学院, 宁夏银川 750004)

(3. 宁夏医科大学临床医学院, 宁夏银川 750004) (4. 宁夏医科大学口腔医学院, 宁夏银川 750004)

(5. 宁夏常见传染病防治重点实验室, 宁夏银川 750004)

摘要: 该研究探讨了富含 α -亚麻酸 (ALA) 的亚麻籽油 (FO) 对多囊卵巢综合征 (PCOS) 大鼠髓源性抑制细胞 (MDSCs)、调节性 T 细胞 (Treg) 和巨噬细胞 (M ψ s) 的调节作用。采用来曲唑造模法建立 PCOS 大鼠模型, 每天监测动情周期变化。造模成功后, FO 对照组和 FO 干预模型组灌胃 FO 8 w; 阴性对照组和模型组灌胃等量生理盐水。干预结束后, 采用流式细胞术检测各组大鼠外周血、脾脏、骨髓中 MDSCs, 外周血和脾脏中 Treg 细胞以及卵巢组织中 M ψ s、M1 型 M ψ s 和 M2 型 M ψ s 比例; 采用免疫荧光技术检测卵巢组织 M ψ s 表达情况。结果显示, 来曲唑诱导的 PCOS 大鼠模型建立成功。与模型组相比, 膳食 FO 干预后外周血、脾脏和骨髓中 MDSCs 比例显著升高至 25.87%、5.63% 和 28.36% ($p < 0.05$); 外周血和脾脏中 Treg 细胞升高至 2.06% 和 1.07% ($p < 0.05$); 卵巢 M ψ s 和 M1 型 M ψ s 比例以及卵巢 M ψ s 荧光强度显著降低至 13.51%、2.27% 和 1.59% ($p < 0.05$)。该研究表明富含 ALA 的 FO 能够通过诱导 MDSCs 在外周血、脾脏和骨髓中募集, 增加外周血和脾脏中 Treg, 以及抑制卵巢 M ψ s 和 M1 型 M ψ s 增殖改善 PCOS。

关键词: 多囊卵巢综合征; 亚麻籽油; 调节性 T 细胞; 髓源性抑制细胞; 巨噬细胞

文章编号: 1673-9078(2022)09-27-37

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.9.1425

Regulation of Flaxseed Oil on Inflammatory Cell in Rats with Polycystic Ovary Syndrome

WANG Ting¹, LI Yiwei¹, LIU Yuanyuan¹, YU Wenwen¹, HU Funing², LUO Xiaojing³, LU Yinan⁴,
ZHANG Xiaoxia^{2*}, WANG Hao^{1,5*}

(1. School of Basic Medical Sciences, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China) (2. College of Traditional Chinese Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China) (3. Clinical Medical College, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China) (4. School of Stomatology, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China) (5. Ningxia Key Laboratory on Prevention and Treatment of Common Infectious Diseases, Yinchuan 750004, China)

Abstract: The regulatory effects of alpha-linolenic acid (ALA)-rich flaxseed oil (FO) on myeloid-derived suppressor cells (MDSCs), regulatory T cells (Tregs), and macrophages (M ψ s) in a rat model of letrozole-induced polycystic ovary syndrome (PCOS) were investigated. Changes in the estrous cycle were also monitored every day. After successful model establishment, the FO control group and FO-treated model group were administered FO *via* gavage feeding for 8 w, whereas the negative control group and model group were administered the same as well as M ψ s, M1 M ψ s and M2 M ψ s in ovary of rats in diverse groups were respectively detected by flow cytometry; the expression of M ψ s

引文格式:

汪婷, 李一唯, 柳媛媛, 等. 亚麻籽油对多囊卵巢综合征大鼠炎症细胞的调节作用[J]. 现代食品科技, 2022, 38(9): 27-37

WANG Ting, LI Yiwei, LIU Yuanyuan, et al. Regulation of flaxseed oil on inflammatory cell in rats with polycystic ovary syndrome [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(9): 27-37

收稿日期: 2021-12-19

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82160691); 宁夏自然科学基金优秀项目 (2021AAC05010); 宁夏自然科学基金面上项目 (2020AAC03132)

作者简介: 汪婷 (1995-), 女, 在读博士研究生, 初级检验师, 研究方向: 免疫相关疾病基础与临床, E-mail: wangting950417@126.com

通讯作者: 王浩 (1982-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 免疫相关疾病基础与临床, E-mail: wanghaograduate@126.com; 共同通讯作者: 张晓霞 (1981-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 亚麻籽组分在慢性代谢性疾病中作用机制, E-mail: zxx1216@163.com

amount of normal saline. After 8 w of treatment, the percentages of MDSCs in the peripheral blood, spleen, and bone marrow, those of Tregs in the peripheral blood and spleen, and those of M ψ s, M1 M ψ s, and M2 M ψ s in the ovaries of rats in all four groups were evaluated using flow cytometry. The expression of M ψ s in the ovarian tissues was determined using immunofluorescence staining. According to the results, letrozole-induced PCOS was successfully established in the rats. Moreover, dietary FO treatment significantly increased the percentages of MDSCs in the peripheral blood, spleen, and bone marrow to 25.87%, 5.63%, and 28.36%, respectively. Additionally, the percentages of Tregs in the peripheral blood and spleen were increased to 2.06% and 1.07%, respectively ($p < 0.05$). By contrast, the percentages of ovarian M ψ s and M1 M ψ s had declined to 13.51% and 2.27%, respectively, whereas the fluorescence intensity of ovarian M ψ s had decreased to 1.59% ($p < 0.05$). Our results indicate that dietary ALA-rich FO supplementation may ameliorate PCOS by recruiting MDSCs in the peripheral blood, spleen, and bone marrow; increasing Tregs in the peripheral blood and spleen; and suppressing M ψ proliferation and M1 M ψ polarization in the ovaries.

Key words: polycystic ovary syndrome (PCOS); flaxseed oil (FO); myeloid-derived suppressor cells (MDSCs); regulatory T cell (Treg); macrophages (M ψ s)

多囊卵巢综合征 (Polycystic Ovary Syndrome, PCOS) 是育龄期女性常见的内分泌紊乱疾病^[1]。依据鹿特丹诊断标准, 我国汉族育龄期女性患病率约为 5.6%^[2,3], 患者主要表现为高雄激素血症、卵巢多囊性改变和排卵障碍^[4]。如果不及时治疗, 还会增加患糖尿病、心血管疾病等慢性代谢性疾病的风险^[5]。然而, PCOS 发病机制复杂, 确切发病机制尚不清楚, 二甲双胍等常用药物在治疗 PCOS 的同时往往伴随一定的胃肠道反应和肝、肾损伤^[6]。因此, 寻找更加安全有效的治疗方案至关重要。

近年来研究发现, 在饮食中添加益生元 Omega-3 多不饱和脂肪酸 (Polyunsaturated Fatty Acids, PUFAs) 有助于改善 PCOS 患者内分泌紊乱^[4,7], 提示 Omega-3 PUFAs 对 PCOS 具有潜在益处。亚麻籽油 (Flaxseed Oil, FO) 是 omega-3 α -亚麻酸 (α -linolenic Acid, ALA) 最主要的植物来源, 具有降血压、降血脂、抗炎等多种功效, 被誉为“液体黄金”^[8,9]。动物和临床研究证实, ALA 来源的 FO 和鱼油干预能够有效降低 PCOS 血脂和睾酮水平, 改善胰岛素代谢紊乱^[10,11]。本团队前期研究^[4]发现, FO 摄入 8 w 后 PCOS 大鼠血浆和卵巢的促炎因子白细胞介素 (Interleukin, IL) -6、IL-1 β 和肿瘤坏死因子- α (Tumor Necrosis Factor α , TNF- α) 显著降低, 抑炎因子 IL-10 增加, 提示富含 ALA 的 FO 对 PCOS 炎症的调节作用。但是, FO 调控炎症因子释放的机制尚不清楚, 有待进一步研究。

众所周知, PCOS 是一种慢性低度炎症性疾病, 患者常表现为促炎性细胞因子升高和炎症细胞的改变^[12]。髓源性抑制细胞 (Myeloid-derived Suppressor Cells, MDSCs) 是病理条件下调节免疫反应的关键因子, 主要分布在骨髓、外周血、脾、肝、肺或各种器官的肿瘤中^[13]。研究发现, MDSCs 能够通过负调控 2 型辅助性 T 细胞 (Helper T cell 2, Th2) 减轻过敏性哮喘小鼠的呼吸道炎症^[14], 提示 MDSCs 具有抗炎和

免疫抑制作用。调节性 T 细胞 (Regulatory T cell, Treg) 能够通过细胞与细胞间接触释放 IL-10 和转化生长因子- β (Transforming Growth Factor- β , TGF- β) 发挥抗炎效应^[15]。此外, 巨噬细胞 (Macrophages, M ψ s) 也具有免疫调控作用^[16], 其中 M1 型 M ψ s 能够分泌大量促炎性细胞因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α ^[17], M2 型 M ψ s 主要分泌 IL-10 抑制炎症反应^[17]。因此, 本研究猜测 FO 可能通过调节炎症细胞 MDSCs、Treg 和 M ψ s 影响 PCOS 炎症因子的释放。

根据以往研究^[18], 采用经典的来曲唑造模法建立 PCOS 大鼠模型, 给予 FO 灌胃干预, 探讨其对 PCOS 大鼠免疫细胞 MDSCs、Treg 和 M ψ s 的作用, 以期为临床防治 PCOS 提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 主要仪器设备

奥林巴斯 BX51 显微镜, 日本 Olympus; CytoFLEX 流式细胞仪, 美国 Beckman。

1.1.2 试剂和材料

来曲唑, 江苏恒瑞; 质量分数 1% 羧甲基纤维素 (Carboxymethyl Cellulose, CMC) 溶液, 上海源叶; FO (ALA 含量 > 56%), 宁夏六盘珍坊; 瑞氏-吉姆萨染色试剂盒, 珠海贝索生物; 大鼠流式抗体 CD11b-FITC 和 His48-FITC, 美国 Thermo 公司; CD4-PE、CD25-BV421 (APC)、CD45-PC7 和 CD86-FITC, 美国 BD 公司; Foxp3-FITC, 美国 eBioscience 公司; CD68-APC, 英国 Abcam 公司; CD163-PE, 北京博奥森生物; 破膜/固定试剂盒, 美国 BD 公司; 大鼠免疫荧光抗体 CD68-CY3, 武汉赛维尔; 一次性负压真空采血管, 山东君诺; 大鼠饲料, 北京科澳。

1.2 实验设计及模型建立

6周龄 SPF 级雌性 SD 大鼠 32 只 (193 ± 10 g) 购买并饲养于宁夏医科大学实验动物中心, 许可证号: SCXK(宁)2015-0001, 相关研究通过了宁夏医科大学伦理委员会的批准(批准号: 2016-017)。大鼠适应性饲养 1 w 后随机分为阴性对照组、模型组、FO 对照组和 FO 干预模型组。采用来曲唑造模法建立 PCOS 大鼠模型^[18]。首先, 模型组和 FO 干预模型组灌胃摄入量为每天 1 mg/kg (以小鼠质量为基准计) 来曲唑 (溶于质量分数 1% CMC 溶液), 连续灌胃给药 21 d; 阴性对照组和 FO 对照组灌胃等量质量分数 1% CMC 溶液; 期间采集大鼠阴道涂片进行瑞氏-吉姆萨染色, 根据镜下细胞形态和种类评估造模是否成功。造模成功后, FO 对照组和 FO 干预模型组每天灌胃摄入 1 mL/kg (以小鼠质量为基准计) 的 FO^[19]; 阴性对照组和模型组灌胃等量生理盐水, 持续灌胃干预 8 w。末次灌胃后禁食 8 h, 称重并麻醉大鼠, 收集大鼠外周血、脾脏、骨髓、卵巢等相关样本处理后用于后续检测。

1.3 测定指标及方法

1.3.1 阴道涂片及染色

从造模第 1 天开始到第 21 天, 每天上午 9:00 收集各组大鼠阴道涂片, 参照瑞氏-吉姆萨染色试剂盒说明书立即进行染色, 随后在光学显微镜下观察各组大鼠阴道脱落细胞形态和种类的变化。

1.3.2 流式细胞术检测大鼠外周血、脾脏和骨髓中 MDSCs

新鲜全血置于抗凝管中离心, 分离出血浆和血细胞, 下层血细胞通过密度梯度离心法分离出外周血单个核细胞^[20]。新鲜脾脏组织研磨后 300 目滤膜过滤, 加入红细胞裂解液裂红、洗涤, 分离出单个核细胞。取适量预冷的 RPMI 1640 反复冲洗大鼠双侧胫骨和股骨的骨髓腔, 收集全部的冲洗液 300 目滤膜过滤, 加入红细胞裂解液裂红、洗涤, 分离出单个核细胞。所有细胞悬液浓度均调整为每毫升 1×10^6 个细胞。随后, 吸取上述细胞悬液各 100 μ L 加入流式管中, 分别加入 1 μ L 抗大鼠 FITC 标记的 His48 以及 PE 标记的 CD11b 表面抗体, 震荡混匀; 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min, 孵育结束后加入 1 mL PBS 清洗细胞; 弃上清, 加入 300 μ L RPMI 1640 重悬, 立即上机检测。

1.3.3 流式细胞术检测大鼠外周血和脾脏中 Treg

外周血和脾脏中单个核细胞的分离方法如上所述, 所有细胞悬液浓度均调整为每毫升 1×10^6 个细胞。随后, 吸取上述细胞悬液各 100 μ L 加入流式管中, 分

别加入 1 μ L 抗大鼠 PE 标记的 CD4 以及 APC 标记的 CD25 表面抗体, 震荡混匀; 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min, 孵育结束后加入 1 mL PBS 清洗细胞; 弃上清, 加入 300 μ L 破膜固定液孵育 30 min; 孵育结束后加入 1 mL 透化液清洗细胞; 弃上清, 加入 1 μ L 抗大鼠 FITC 标记的 Foxp3 抗体, 吹打混匀; 后续方法同前, 上机检测。

1.3.4 流式细胞术检测卵巢 M ψ s、M1 型 M ψ s 和 M2 型 M ψ s

大鼠卵巢组织在解剖镜下用注射器针头刺破卵泡, 使颗粒细胞释放入预冷的 RPMI 1640 中^[21]; 加入 0.25% 胰蛋白酶 1 mL 置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中消化 12 min; 终止消化后 300 目滤膜过滤, 加入红细胞裂解液裂红、洗涤, 分离出单个核细胞, 调整细胞悬液浓度为每毫升 1×10^6 个细胞。吸取各组细胞悬液 100 μ L 加入流式管中, 分别加入 1 μ L 抗大鼠 PC7 标记的 CD45、APC 标记的 CD68、FITC 标记的 CD86 以及 PE 标记的 CD163 表面抗体, 震荡混匀; 后续方法同前, 上机检测。

1.3.5 免疫荧光检测卵巢 M ψ s

参照前人研究^[22], 进行卵巢 M ψ s 免疫荧光染色。卵巢石蜡切片在 65 $^{\circ}$ C 恒温箱中烘烤 2 h 后脱蜡至水, 随后进行抗原修复, 加入牛血清白蛋白常温封闭 30 min; 滴加兔抗大鼠 CD68 抗体(1:200), 湿盒内 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 滴加 CY3 标记的山羊抗兔抗体(1:200), 避光室温孵育 60 min; 滴加含 DAPI 的封片剂; 在荧光显微镜下观察并采集图像。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 21.0 和 GraphPad Prism 6.01 软件处理实验数据。实验数据以均数 \pm 标准差表示, 多组间差异比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 SNK-q 检验法。以 $p < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 卵巢病理组织形态学

PCOS 患者临床表现多样化且病因复杂, 建立与临床表现吻合度高且创伤性小的动物模型对疾病的深入研究至关重要。大量研究证明, 来曲唑造模法诱导的 PCOS 大鼠模型动情周期紊乱, 卵巢组织呈多囊性改变, 很大程度上具备了临床 PCOS 患者的病理生理特点, 广泛用于 PCOS 动物研究^[23]。因此, 本研究选用 6 周龄雌性 SD 大鼠通过来曲唑灌胃法建立模型。

阴道涂片法对实验动物无创伤性且具有准确、实用等优点, 是判定大鼠动情周期最常用的方法之一^[24]。因此, 每日采集大鼠阴道涂片进行染色以判定各组大

鼠的动情周期是否正常以及各周期持续的时间。如图 1 所示, 动情周期包括四个阶段, 动情前期: 多为有核上皮细胞、少量无核的角化上皮细胞 (图 1a); 动情期: 全部为无核的角化上皮细胞 (图 1b); 动情后期: 可见有核上皮细胞、角化上皮细胞及白细胞 (图 1c); 动情间期: 大量白细胞及少量黏液 (图 1d)。结果显示, 阴性对照组和 FO 对照组大鼠阴道涂片可见周期性变化, 一个周期约为 4~5 d (图 1e~1g), 该结果提示有排卵。

模型组和 FO 干预模型组大鼠在来曲唑干预 12 d 后逐渐失去规律的动情周期, 干预 18 d 后处于持续的动情间期 (图 1f~1h)。以往有研究证实, SD 大鼠在来曲唑诱导 16 d 后处于持续的动情间期^[25], 本研究结果与之类似, 说明来曲唑诱导的 PCOS 大鼠出现了排卵障碍。此外, 结合本课题前期研究, 模型组大鼠卵巢组织中黄体消失、卵泡发育异常、呈多囊样改变的结果^[26], 表明来曲唑诱导的 PCOS 大鼠模型建立成功。

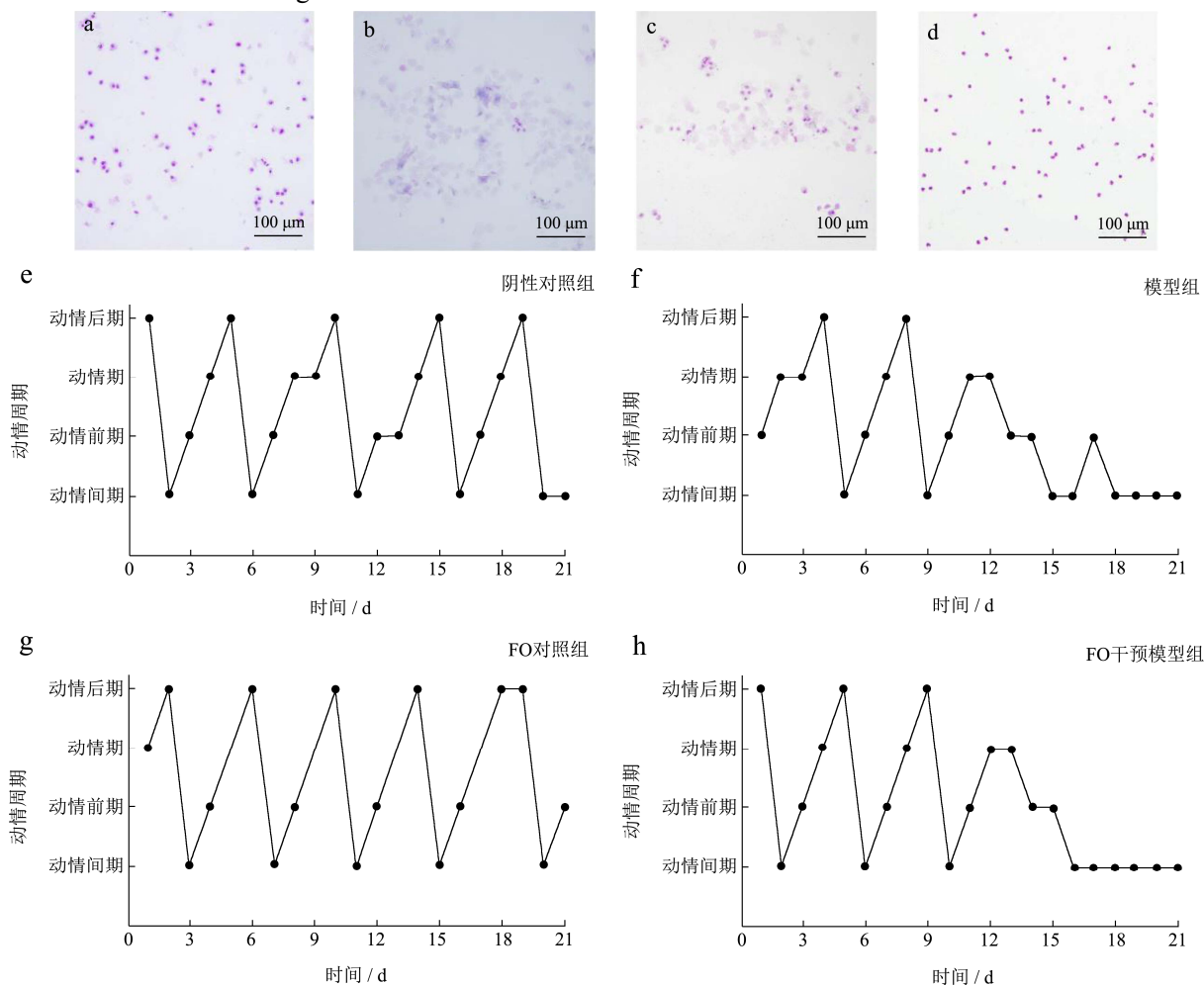


图 1 光镜下大鼠阴道脱落细胞染色图和动情周期统计图

Fig.1 Staining of vaginal exfoliative cells under light microscope and statistical chart of estrus cycles in rats

注: a~d 为瑞氏-吉姆萨染色, ×100。a: 动情前期; b: 动情期; c: 动情后期; d: 动情间期; e~h: 各组大鼠动情周期统计图。

2.2 FO 干预增加 PCOS 大鼠外周血、脾脏、骨髓细胞中 MDSCs 比例

前期研究证实, PCOS 进程与慢性低度炎症密切相关, 富含 ALA 的 FO 干预后通过降低促炎因子水平和增加抗炎因子产生改善了 PCOS 炎症状态^[4]。然而, FO 调控炎症因子释放的机制尚不清楚。MDSCs 主要分布在骨髓、外周血、脾、肝、肺等组织器官中, 在调节炎症过程中具有双向作用, 既可以防止过度的炎

症反应, 同时又能维持一种慢性低度炎症状态^[27]。有研究发现, 在感染和炎症过程中, 未成熟的髓样细胞 (Immature Myeloid Cells, IMC) 可以通过不同的激活信号 (如炎症刺激) 分化为 MDSCs, 并诱导 MDSCs 在炎症组织富集, 从而维持慢性炎症反应^[28]。然而, 当 MDSCs 在外周血、脾以及炎症组织中持续增殖后, 又能够抑制其向成熟的髓系细胞分化, 从而抑制炎症反应, 触发炎症消退和启动修复过程, 发挥免疫抑制功能^[29]。据此, 本研究对外周血、脾脏、骨髓中的 MDSCs 进行了分析。

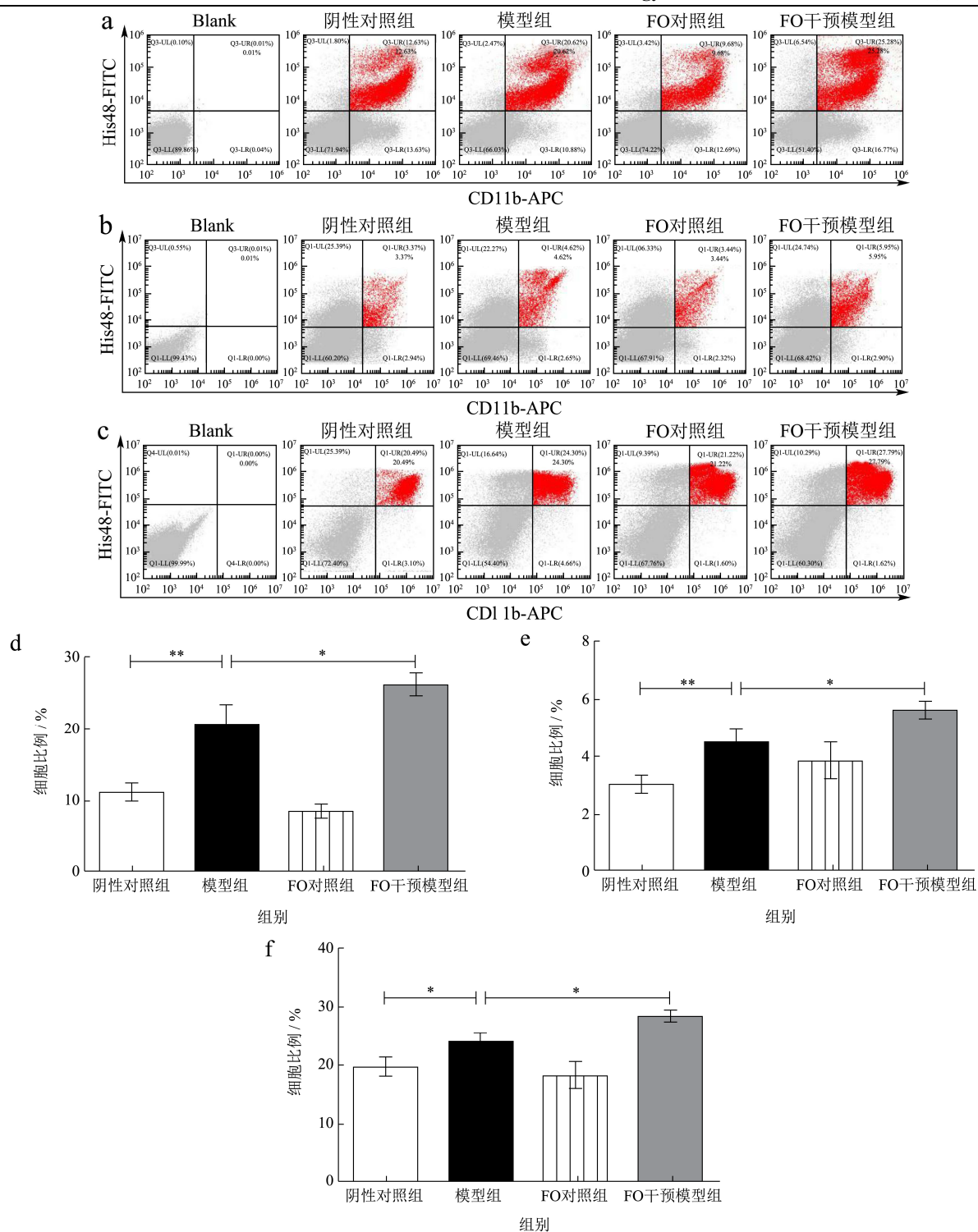


图2 FO干预对PCOS大鼠外周血、脾脏、骨髓MDSCs比例的影响

Fig.2 Effects of FO intervention on the proportion of MDSCs in peripheral blood, spleen and bone marrow of PCOS in rats

注: a、d: 外周血中 MDSCs; b、e: 脾脏中 MDSCs; c、f: 骨髓中 MDSCs; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

图2结果显示,骨髓中MDSCs比例最高,外周血中次之,脾脏中MDSCs相对较少(图2a~2c)。阴性对照组外周血、脾脏、骨髓中MDSCs细胞比例分别是11.14%、3.02%和19.37%(图2d~2f)。与阴性对照组相比,模型组外周血、脾脏和骨髓中MDSCs显著高至20.53%、4.48%和23.88%($p < 0.05$,图2d~2f)。

已有研究证实,脱氢表雄酮加高脂诱导的PCOS小鼠外周血、脾脏和肝脏中MDSCs比例增加,且与炎症因子呈现显著相关性,本研究结果与之一致^[12]。结合前期研究^[4],本研究推测可能是促炎性细胞因子升高促进了MDSCs在大鼠外周血、脾脏、骨髓中募集。有趣的是,与模型组下相比,膳食FO干预后外周血、

脾脏、骨髓中 MDSCs 仍持续升高至 25.87%、5.63% 和 28.36% ($p < 0.05$, 图 2d~2f), 可能是 FO 干预后 MDSCs 大量增殖进一步发挥了免疫抑制作用。一项研究^[20]发现, FO 摄入 5 w 后能够显著增加 2 型糖尿病 (Type 2 Diabetes Mellitus, T2DM) 大鼠外周血和脾脏中 MDSCs 比例, 降低促炎因子 IL-1 β 和 TNF- α 释

放。由此说明, FO 干预可能通过促进 PCOS 大鼠外周血、脾脏、骨髓中 MDSCs 增殖改善炎症因子释放。

2.3 FO 干预增加 PCOS 大鼠外周血和脾脏中 Treg 比例

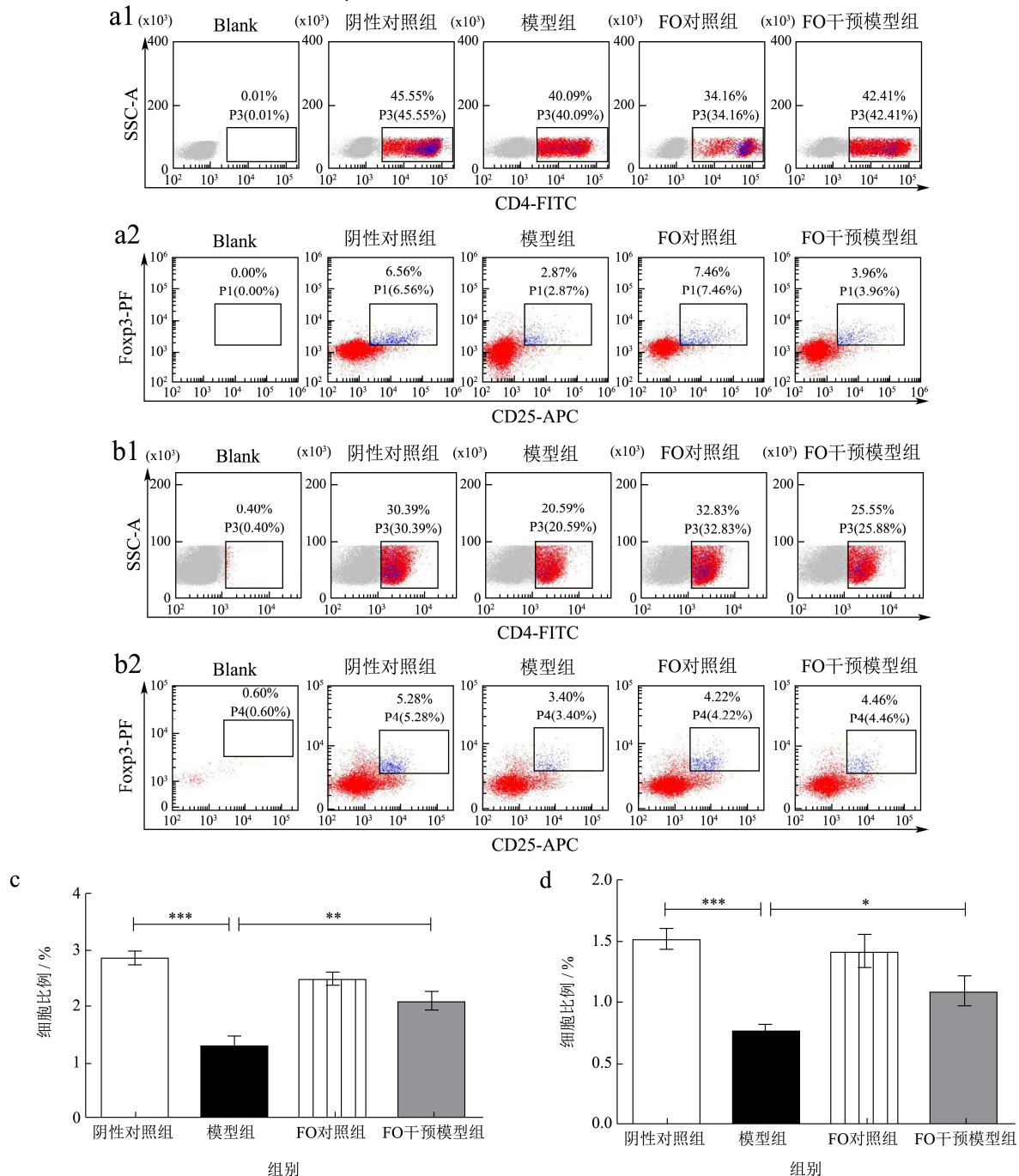


图 3 FO 干预对 PCOS 大鼠外周血和脾脏 Treg 比例的影响

Fig.3 Effects of FO intervention on the percentage of Treg in peripheral blood and spleen of PCOS in rats

注: a、c: 外周血中 Treg; b、d: 脾脏中 Treg; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。

Treg 细胞是 CD4⁺T 细胞的一种特异性谱系, 能够适应局部微环境的变化进行迁移、增殖、存活和分化, 在维持免疫稳态和限制过度免疫反应中发挥着重要作用

用^[30]。研究发现, Treg 细胞激活能够产生抗炎因子 IL-10 和 TGF- β 来抑制幼稚 T 细胞增殖^[31], 发挥抗炎效应。因此, 研究 Treg 细胞的变化和作用可能为防治

PCOS 提供新的分子靶点。

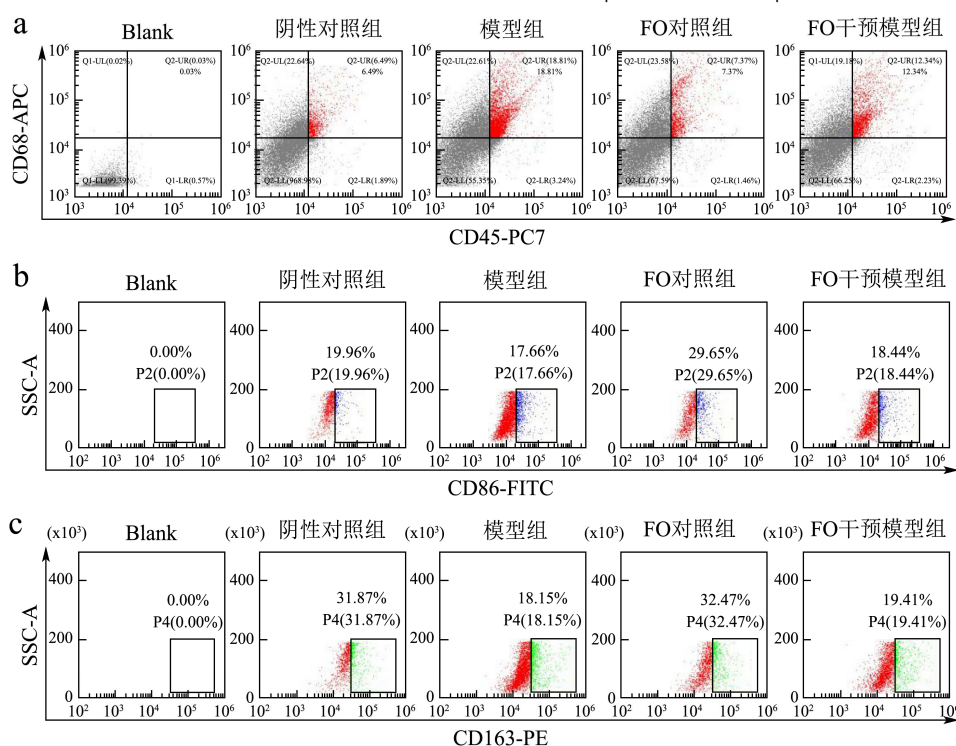
采用 CD4、CD25 和 Foxp3 标记 Treg 细胞^[32]。如图 3 所示, 阴性对照组外周血和脾脏中 Treg 细胞比例分别是 2.85% 和 1.50%。与阴性对照组相比, 模型组外周血和脾脏中 Treg 细胞显著降低至 1.29% 和 0.76% ($p < 0.01$, 图 3c~3d), 与本课题前期研究 PCOS 大鼠抗炎细胞因子 IL-10 降低相一致^[4]。临床研究^[33]发现, PCOS 患者外周血 Treg 细胞较对照组显著降低, 同时伴随着慢性低度炎症, 这与本研究结果相一致。与模型组相比, FO 干预后外周血和脾脏中 Treg 细胞升高至 2.06% 和 1.07% ($p < 0.05$, 图 3c~3d), 但仍低于阴性对照组。结合前期研究推测^[4], FO 干预后在一定程度上增加了 Treg 细胞比例, 进而刺激抗炎因子 IL-10 产生, 增强抗炎作用, 维持免疫稳态。

2.4 FO 干预降低 PCOS 大鼠卵巢中 M Ψ s 比例

M Ψ s 是机体固有免疫系统的重要组成部分, 广泛分布在各个组织与器官, 具有极强的异质性和可塑性^[16]。在不同微环境下 M Ψ s 可极化为 M1 型 M Ψ s 和 M2 型 M Ψ s^[34], M1 型 M Ψ s 通过分泌促炎性细胞因子和趋化因子参与正向免疫应答^[34], 在炎症反应的起始阶段起关键作用, 同时引起组织损伤^[34]; M2 型 M Ψ s 分泌 IL-10 和 TGF- β 等发挥负向免疫调控作用^[17], 促进炎症消除和组织损伤修复。近年来研究发现, M Ψ s 在 LPS 等炎症刺激物的诱导下激活, 迅速合成并释放大量的炎症介质、炎症细胞因子和黏附分子等, 引起

M1/M2 极化失衡, 从而引发全身组织炎症和代谢功能障碍^[35]。然而, 至今仍没有公认的分子标志来鉴定和区分不同类型的 M Ψ s^[36]。目前, 报道最多的谱系标志是 CD45⁺CD68⁺为 M Ψ s, CD45⁺CD68⁺CD86⁺为 M1 型 M Ψ s, CD45⁺CD68⁺CD163⁺为 M2 型 M Ψ s^[37], 故本研究采用其作为检测标志分子。

图 4 结果显示, 阴性对照组卵巢 M Ψ s、M1 型 M Ψ s 以及 M2 型 M Ψ s 比例分别是 8.09%、1.54% 和 2.27% (图 4d~4f)。与阴性对照组相比, 模型组卵巢 M Ψ s 和 M1 型 M Ψ s 显著升高至 18.30% 和 2.85% ($p < 0.01$, 图 4d~4e), M2 型 M Ψ s 升高至 2.73%, 但差异无统计学意义 ($p > 0.05$, 图 4f)。动物研究发现, 脱氢表雄酮诱导的 PCOS 小鼠脾脏 M Ψ s 和 M1 型 M Ψ s 显著增加, 并伴随全身炎症反应和排卵障碍^[38], 本研究结果与之类似, 提示卵巢 M Ψ s 增加与 PCOS 全身慢性炎症密切相关。与模型组相比, 膳食 FO 干预后, 卵巢 M Ψ s 和 M1 型 M Ψ s 比例均降低至 13.51% 和 2.27% ($p < 0.05$, 图 4d~4e), 但仍高于阴性对照组; M2 型 M Ψ s 升高至 2.64%, 但无统计学意义 ($p > 0.05$, 图 4f)。动物研究发现, omega-3 PUFA 通过与 G 蛋白偶联受体 (G-protein-coupled Receptors, GPR) 120 相互作用抑制 M Ψ s 迁移和浸润, 进而减轻小鼠的血管炎症、动脉血栓形成和新生内膜增生^[39]。上述结果提示, FO 干预能够抑制 PCOS 大鼠卵巢 M Ψ s 和 M1 型 M Ψ s 增殖, 但对 M2 型 M Ψ s 作用不明显, 推测 FO 干预可能通过抑制 M Ψ s 和 M1 型 M Ψ s 增殖改善 PCOS 大鼠炎症。



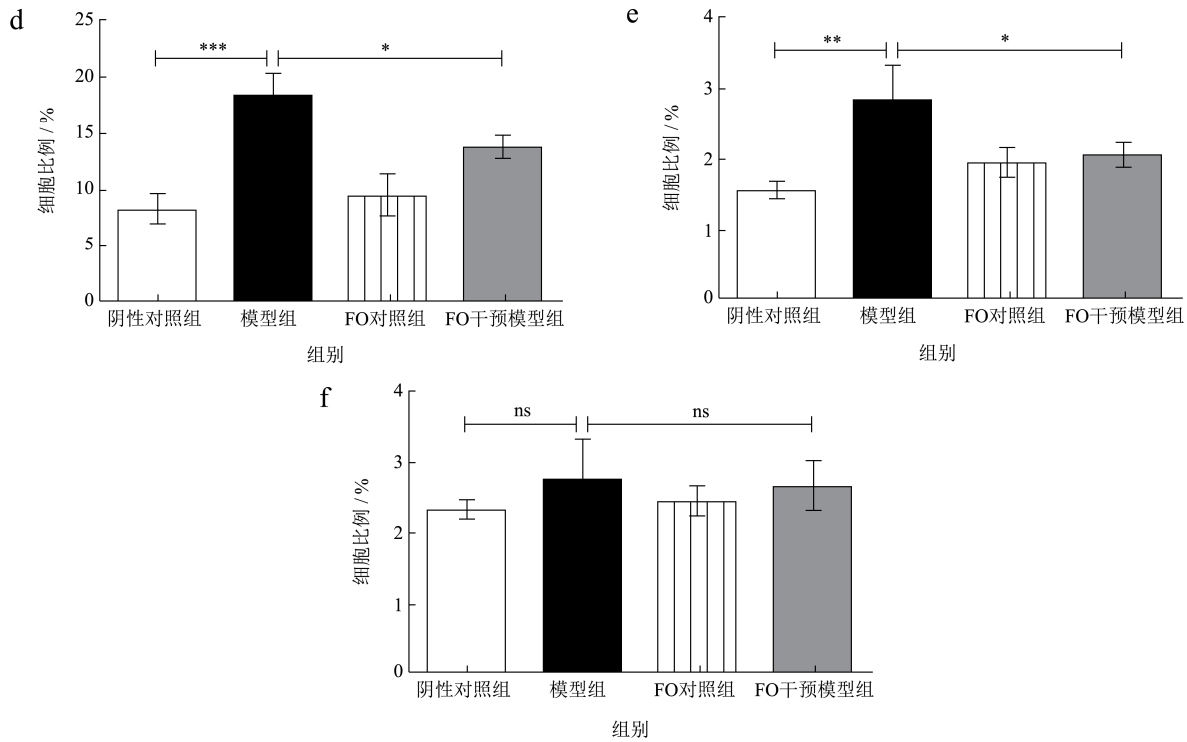


图4 FO干预对PCOS大鼠卵巢Mψs、M1型Mψs和M2型Mψs比例的影响

Fig.4 Effects of FO intervention on the percentage of Mψs, M1 Mψs and M2 Mψs of ovary in PCOS rats

注: a, d: 卵巢中Mψs; a, b, e: 卵巢中M1型Mψs; a, c, f: 卵巢中M2型Mψs; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns: $p > 0.05$ 。

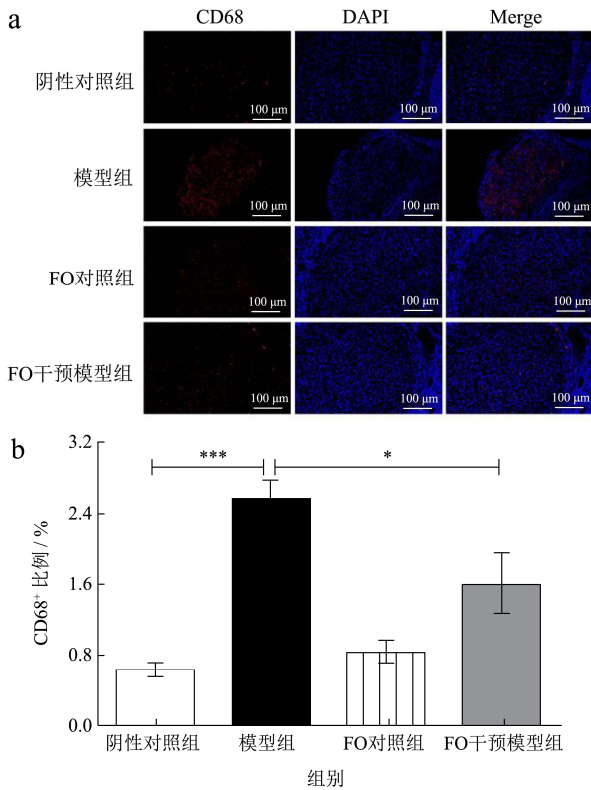


图5 免疫荧光检测FO干预对PCOS大鼠卵巢Mψs比例的影响

Fig.5. Immunofluorescence analysis of percentage of Mψs from ovary in PCOS rats after FO intervention (×100)

注: a: 卵巢中Mψs免疫荧光; b: 卵巢中Mψs荧光强度的定量分析; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ 。

近年来研究发现, 卵巢组织中定居的单核 Mψs 可诱导 PCOS 患者卵巢颗粒细胞凋亡^[40]。卵巢中 Mψs 分泌的各种细胞因子还会影响卵泡的生长发育、排卵以及黄体的形成和功能, 提示卵巢 Mψs 参与 PCOS 进程^[41]。因此, 本研究进一步通过免疫荧光对卵巢 Mψs 进行定量、定位分析。图 5b 结果显示, 阴性对照组 Mψs 荧光强度为 0.62%, 模型组 Mψs 荧光强度较阴性对照组显著升高至 2.55% ($p < 0.001$, 图 5b), 说明 PCOS 大鼠卵巢出现了 Mψs 浸润, 与前人脱氢表雄酮诱导的 PCOS 大鼠卵巢组织中 Mψs 浸润的报道相一致^[42]。与模型组相比, 膳食 FO 干预后 Mψs 荧光强度降低至 1.59% ($p < 0.05$, 图 5b), 但仍高于阴性对照组, 该结果与流式结果趋势一致, 推测 FO 干预后可能通过改善 Mψs 在卵巢的浸润降低 PCOS 的慢性低度炎症状态。综上所述, FO 干预能够降低卵巢 Mψs 水平, 以其为靶点可能为治疗 PCOS 提供新的思路。

此外, 近年来研究发现, $\gamma\delta T$ 细胞、固有淋巴样细胞 (Innate Lymphoid Cells, ILCs) 和 Th17 细胞等炎症细胞也参与了炎症性疾病的发生和发展^[43,44]。本研究推测, FO 对 PCOS 大鼠 MSDCs、Treg 和 Mψs 的调节作用只是改善炎症的机制之一, 其他免疫细胞也可能参与了 PCOS 发展进程。

3 结论

本研究在前期研究证实富含ALA的FO能够改善PCOS大鼠炎症的基础上,进一步探讨其对炎症相关免疫细胞MSDCs、Treg和M ψ s的作用。本研究证实了来曲唑诱导的PCOS大鼠存在动情周期紊乱和炎症细胞改变,FO摄入能够促进MDSCs在外周血、脾脏和骨髓细胞中富集,增加PCOS大鼠外周血和脾脏中Treg比例以及抑制卵巢中M ψ s和M1型M ψ s增殖,进而发挥负调控作用,改善PCOS炎症状态。本研究为临床进一步探索PCOS的作用靶点提供了新的方案和思路。

参考文献

- [1] Homburg R. Polycystic ovary syndrome [J]. Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology, 2008, 22(2): 261-274
- [2] 袁莹莹,赵君利.多囊卵巢综合征流行病学特点[J].中国实用妇科与产科杂志,2019,35(3):261-264
YUAN Yingying, ZHAO Junli. Epidemiological characteristics of polycystic ovary syndrome [J]. Chinese Journal of Practical Gynecology and Obstetrics, 2019, 35(3): 261-264
- [3] Li R, Zhang Q, Yang D, et al. Prevalence of polycystic ovary syndrome in women in China: a large community-based study [J]. Human Reproduction, 2013, 28(9): 2562-2569
- [4] Wang T, Sha L, Li Y, et al. Dietary alpha-linolenic acid-rich flaxseed oil exerts beneficial effects on polycystic ovary syndrome through sex steroid hormones-microbiota-inflammation axis in rats [J]. Frontiers in Endocrinology (Lausanne), 2020, 11: 284
- [5] Grigoryan O R, Zhemaite N S, Volevodz N N, et al. Long-term consequences of polycystic ovary syndrome [J]. Terapevticheskii Arkhiv, 2017, 89(10): 75-79
- [6] Sharpe A, Morley L C, Tang T, et al. Metformin for ovulation induction (excluding gonadotrophins) in women with polycystic ovary syndrome [J]. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2019, 12: D13505
- [7] Kasim-Karakas S E, Almario R U, Gregory L, et al. Metabolic and endocrine effects of a polyunsaturated fatty acid-rich diet in polycystic ovary syndrome [J]. Journal Clinical Endocrinology Metablism, 2004, 89(2): 615-620
- [8] Goyal A, Sharma V, Upadhyay N, et al. Flax and flaxseed oil: an ancient medicine & modern functional food [J]. Journal of Food Science and Technology-mysore, 2014, 51(9): 1633-1653
- [9] Campos J R, Severino P, Ferreira C S, et al. Linseed essential oil - source of lipids as active ingredients for pharmaceuticals and nutraceuticals [J]. Current Medicinal Chemistry, 2019, 26(24): 4537-4558
- [10] Mirmasoumi G, Fazilati M, Foroozanfard F, et al. The effects of flaxseed oil omega-3 fatty acids supplementation on metabolic status of patients with polycystic ovary syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial [J]. Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes, 2018, 126(4): 222-228
- [11] Komal F, Mahr-Un-Nisa, Khan M K, et al. Evaluation of the efficacy of different sources of omega-3 fatty acids in polycystic ovarian syndrome (PCOS) induced rats [J]. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 2019, 32(4(Supplementary)): 1781-1788
- [12] 薛静,李晓荣,李珂,等.菊粉对多囊卵巢综合征小鼠外周血、脾脏、肝脏髓源抑制性细胞及血浆炎症因子的影响[J].免疫学杂志,2019,35(2):97-104
XUE Jing, LI Xiaorong, LI Ke, et al. Effects of inulin on myeloid-derived suppressor cells in peripheral blood, spleen and liver of mice and plasma inflammatory factors in polycystic ovary syndrome [J]. Journal of Immunology, 2019, 35(2): 97-104
- [13] Karin N. The development and homing of myeloid-derived suppressor cells: from a two-stage model to a multistep narrative [J]. Frontiers in Immunology, 2020, 11: 557586
- [14] Cao Y, He Y, Wang X, et al. Polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells attenuate allergic airway inflammation by negatively regulating group 2 innate lymphoid cells [J]. Immunology, 2019, 156(4): 402-412
- [15] 袁琴,刘朝奇,袁丁.Th17 细胞和调节性 T 细胞在炎症性疾病中的研究进展[J].细胞与分子免疫学杂志,2016,32(4): 564-567
YUAN Qin, LIU Zhaoqi, YUAN Ding. Advances in Th17 cells and regulatory T cells in inflammatory diseases [J]. Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2016, 32(4): 564-567
- [16] 刘佳宁,王鑫雅,孙玥.巨噬细胞极化对炎症性疾病影响的研究进展[J].生物化工,2020,6(1):112-115
LIU Jianing, WANG Xinya, SUN Yue. Research progress on the effect of macrophage polarization on inflammatory diseases [J]. Biochemical Engineering, 2020, 6(1): 112-115
- [17] Wang Z, Zhang X, Zhu L, et al. Inulin alleviates inflammation of alcoholic liver disease via SCFAs-inducing suppression of M1 and facilitation of M2 macrophages in

- mice [J]. *International Immunopharmacology*, 2020, 78: 106062
- [18] Kafali H, Iriadam M, Ozardali I, et al. Letrozole-induced polycystic ovaries in the rat: a new model for cystic ovarian disease [J]. *Archives of Medical Research*, 2004, 35(2): 103-108
- [19] Pilar B, Gullich A, Oliveira P, et al. Protective role of flaxseed oil and flaxseed lignan secoisolariciresinol diglucoside against oxidative stress in rats with metabolic syndrome [J]. *Food Sci Tech Journal*, 2017, 82(12): 3029-3036
- [20] 朱丽丽,张晚霞,王振,等.富含亚麻酸的膳食亚麻籽油对 2 型糖尿病大鼠外周血和脾脏髓源抑制细胞及炎症因子的影响[J].*中国免疫学杂志*,2020,36(2):136-140
ZHU Lili, ZHANG Xiaoxia, WANG Zhen, et al. Effects of dietary flaxseed oil rich in linolenic acid on myeloid inhibitory cells and inflammatory factors in peripheral blood and spleen of type 2 diabetic rats [J]. *Chinese Journal of Immunology*, 2020, 36(2): 136-140
- [21] 阳丽,吴湘,李昂,等.黄芪多糖调控 Sirt1/FoxO1 通路抑制多囊卵巢综合征大鼠颗粒细胞自噬的研究[J].*中国比较医学杂志*,2021,31(10):93-98
YANG Li, WU Xiang, LI Ang, et al. Effect of astragalus polysaccharides on the inhibition of autophagy by Sirt1/FoxO1 pathway in rat granulosa cells with polycystic ovary syndrome [J]. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 2021, 31(10): 93-98
- [22] 谢颖颖,邵华,郑俊克,等.不同的固定及渗透方法对小鼠卵母细胞免疫荧光染色的影响[J].*上海交通大学学报(医学版)*,2008,3:349-352
XIE Yingying, SHAO Hua, ZHENG Junke, et al. Effects of different immobilization and infiltration methods on immunofluorescence staining of mouse oocytes [J]. *Journal of Shanghai Jiaotong University (Medical Sciences)*, 2008, 3: 349-352
- [23] Atef M M, Abd-Ellatif R N, Emam M N, et al. Therapeutic potential of sodium selenite in letrozole induced polycystic ovary syndrome rat model: targeting mitochondrial approach (selenium in PCOS) [J]. *Archives of Biochemistry Biophysics*, 2019, 671: 245-254
- [24] 王洁,吴素慧,尚海霞.性成熟雌性 SD 大鼠动情周期的观察[J].*当代医学*,2013,19(28):25-26
WANG Jie, WU Suhui, SHANG Haixia. Observation of estrous cycle in sexually mature female SD rats [J]. *Contemporary Medical*, 2013, 19(28): 25-26
- [25] Li C, Chen L, Zhao Y, et al. Altered expression of miRNAs in the uterus from a letrozole-induced rat PCOS model [J]. *Gene*, 2017, 598: 20-26
- [26] 汪婷,张晚霞,李一唯,等.亚麻籽油对多囊卵巢综合征大鼠胰岛素抵抗和氧化应激的保护作用[J].*现代食品科技*,2020, 36(7):17-24
WANG Ting, ZHANG Xiaoxia, LI Yiwei, et al. Protective effects of α -linolenic acid riched flaxseed oil on suppressing insulin resistance and oxidative stress in rats with polycystic ovary syndrome [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2020, 36(7): 17-24
- [27] Salminen A, Kaamiranta K, Kauppinen A. The role of myeloid-derived suppressor cells (MDSC) in the inflammaging process [J]. *Ageing Research Reviews*, 2018, 48: 1-10
- [28] Millrud C R, Bergenfelz C, Leandersson K. On the origin of myeloid-derived suppressor cells [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(2): 3649-3665
- [29] Beury D W, Parker K H, Nyandjo M, et al. Cross-talk among myeloid-derived suppressor cells, macrophages, and tumor cells impacts the inflammatory milieu of solid tumors [J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2014, 96(6): 1109-1118
- [30] Alvarez F, Al-Aubodah T A, Yang Y H, et al. Mechanisms of TREG cell adaptation to inflammation [J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2020, 108(2): 559-571
- [31] 楚思,范恒.间充质干细胞来源的细胞外囊泡在炎症性肠病中的研究[J].*胃肠病学和肝病学杂志*,2020,29(9):965-968
CHU Si, FAN Heng. Study on extracellular vesicles derived from mesenchymal stem cells in inflammatory bowel disease [J]. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2020, 29(9): 965-968
- [32] 陈祚珈,高雅懿,李志远,等.FOXP3⁺调节性 T 细胞[J].*生命科学*,2010,22(6):515-528
CHEN Zuojia, GAO Yayi, LI Zhiyuan, et al. Foxp3⁺ regulatory T cells [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2010, 22(6): 515-528
- [33] Yang Y, Xia J, Yang Z, et al. The abnormal level of HSP70 is related to Treg/Th17 imbalance in PCOS patients [J]. *Journal of Ovarian Research*, 2021, 14(1): 155
- [34] Ross E A, Devitt A, Johnson J R. Macrophages: the good, the bad, and the gluttony [J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 708186
- [35] Oishi Y, Manabe I. Macrophages in inflammation, repair and regeneration [J]. *International Immunology*, 2018, 30(11): 511-528
- [36] 李康,郭强,王翠妮,等.M1 和 M2 型巨噬细胞表型的比较分

- 析[J].现代免疫学,2008,3:177-183
- LI Kang, GUO Qiang, WANG Cuini, et al. Comparative analysis of phenotype of M1 and M2 macrophages [J]. *Modern Immunology*, 2008, 3: 177-183
- [37] 朱海. 脊髓损伤大鼠局部浸润的巨噬细胞亚群的变化[D]. 蚌埠:蚌埠医学院,2013
- ZHU Hai. Changes of local infiltrating macrophage subsets in rats with spinal cord injury [D]. Bengbu: Bengbu Medical College, 2013
- [38] Xie Q, Xiong X, Xiao N, et al. Mesenchymal stem cells alleviate DHEA-induced polycystic ovary syndrome (PCOS) by inhibiting inflammation in mice [J]. *Stem Cells International*, 2019, 2019: 9782373
- [39] Li X, Ballantyne L L, Che X, et al. Endogenously generated omega-3 fatty acids attenuate vascular inflammation and neointimal hyperplasia by interaction with free fatty acid receptor 4 in mice [J]. *Journal of the American Heart Association*, 2015, 4(4)
- [40] Lima P, Nivet A L, Wang Q, et al. Polycystic ovary syndrome: possible involvement of androgen-induced, chemerin-mediated ovarian recruitment of monocytes/macrophages [J]. *Reproductive Biology*, 2018, 99(4): 838-852
- [41] 尹小瑞,王莹东,柳铮男,等.巨噬细胞在卵巢生理和病理情况下作用的研究进展[J].东南大学学报(医学版),2021,40(1): 119-124
- YIN Xiaorui, WANG Yingdong, LIU Zhengnan, et al. Research progress on the role of macrophages in physiological and pathological conditions of ovary [J]. *Journal of Southeast University (Medical Science edition)*, 2021, 40(1): 119-124
- [42] Jang M, Lee M J, Lee J M, et al. Oriental medicine Kyung-Ok-Ko prevents and alleviates dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovarian syndrome in rats [J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e87623
- [43] Asghar P M, Yang Q. Innate lymphoid cells in airway inflammation [J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2021, 1303: 183-191
- [44] Murdoch J R, Gregory L G, Lloyd C M. Gammadelta T cells regulate chronic airway inflammation and development of airway remodelling [J]. *Clinical and Experimental Allergy*, 2014, 44(11): 1386-1398