

· 基础研究 ·

电针对 PCOS 大鼠子宫内膜 IRS1 和 IRS2 mRNA 表达及胰岛素敏感性的影响

赖毛华 马红霞 李娟 宋兴华 刘华

摘要 **目的** 观察电针对多囊卵巢综合征(PCOS)大鼠子宫内膜胰岛素受体底物(IRS)1 和 IRS2 基因表达及胰岛素敏感性的影响,为电针提高 PCOS 患者妊娠率,减少流产率的临床应用提供实验依据。**方法** 24 日龄雌性 SD 大鼠皮下注射脱氢表雄酮(DHEA)的麻油溶液结合高脂饮食造模,正常组同期皮下注射麻油,喂以普通饲料;PCOS 大鼠模型随机分为模型组、电针组,各组均于 80 日龄起进行干预,其中电针组电针治疗,1 周 3 次,连续 5 周,而正常组、模型组每天只捆绑不针刺,1 周 3 次,连续 5 周。治疗前后尾静脉取血,氧化酶法测定空腹血糖(FPG)水平,罗氏电化学发光法测定空腹胰岛素(FINS)水平,计算稳态模型胰岛素抵抗指数(HOMA-IR 指数),治疗结束后,各组大鼠断头处死,留取子宫内膜标本,用实时定量荧光 PCR 法检测子宫内膜组织 IRS1、IRS2 mRNA 表达。**结果** 各组治疗前后的 FPG 水平变化差异均无统计学意义($P > 0.05$);治疗前,模型组 FINS 水平、HOMA-IR 指数均显著高于正常组($P < 0.05$);治疗后,电针组 FINS、HOMA-IR 水平显著低于模型组($P < 0.05$);与正常组比较,模型组子宫内膜组织 IRS1、IRS2 mRNA 表达升高($P < 0.05$);与模型组比较,电针组子宫内膜组织 IRS1、IRS2 mRNA 表达降低($P < 0.05$)。**结论** 电针具有改善 PCOS 大鼠胰岛素敏感性,提高子宫内膜组织 IRS1、IRS2 mRNA 表达的作用,这可能是其改善子宫内膜胰岛素抵抗的机制之一。

关键词 胰岛素抵抗;多囊卵巢综合征;胰岛素受体底物 1;胰岛素受体底物 2;电针

Effects of Electroacupuncture on mRNA Expressions of Insulin-receptor Substrates 1 and 2 in the Endometrium of PCOS Rats and Insulin Sensitivity LAI Mao-hua, MA Hong-xia, LI Juan, SONG Xing-hua, and LIU Hua *Department of Traditional Chinese Medicine, First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou (510120)*

ABSTRACT **Objective** To observe the effects of electroacupuncture (EA) on gene expressions of insulin receptor substrate 1 (IRS1) and insulin receptor substrate 2 (IRS2) in the endometrium and insulin sensitivity (IS) of polycystic ovary syndrome (PCOS) rats, thereby providing basic evidence of clinical application of EA for improving the pregnancy rate of PCOS patients and reducing the abortion rate. **Methods** Dehydroepiandrosterone (DHEA) was subcutaneously injected to 24-day-old female SD rats to induce PCOS model. Besides, rats were fed with high-fat diet. Rats in the normal group were subcutaneously injected with sesame oil and fed with common forage. PCOS model rats were randomly divided into the model group and the EA group. All rats were intervened from 80 days old. Of them, EA was started to rats in the EA group, three times per week for 5 successive weeks. Rats in the normal group and the model group were only bound every day, but with no acupuncture, three times per week for 5 successive weeks. Blood was collected from caudal vein before and after treatment. Fasting blood glucose (FPG) was detected by oxidase method. Fasting insulin (FINS) level was determined by Roche electrochemical luminescence method. Homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) index was also calculated. All rats were killed by decapitation by the end of intervention, and their endometria were collected. mRNA ex-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81302999)

作者单位:广州医科大学附属第一医院中医科(广州 510120)

通讯作者:赖毛华, Tel:13926205068, E-mail:lmhlchy@126.com

DOI: 10.7661/CJIM.2016.09.1082

pressions of IRS1 and IRS2 in the endometrial tissue were detected by Real-time fluorescence quantitative PCR method. Results Pre-post-treatment changes of FPG level were not significantly different among the three groups ($P > 0.05$). Before treatment FINS level and HOMA-IR index were significantly higher in the model group than in the normal group ($P < 0.05$). After treatment, they were significantly lower in the EA group than in the model group ($P < 0.05$). Compared with the normal group, mRNA expressions of IRS1 and IRS2 in the endometrial tissue were decreased in the model group ($P < 0.05$). Compared with the model group, mRNA expressions of IRS1 and IRS2 in the endometrial tissue were increased in the EA group ($P < 0.05$). Conclusion EA could improve IS and elevate mRNA expressions of IRS1 and IRS2 in the endometrial tissue of PCOS rats, which might be one of mechanisms for improving endometrial IS.

KEYWORDS insulin resistance; polycystic ovary syndrome; insulin receptor substrate1; insulin receptor substrate2; electroacupuncture

多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)是育龄期妇女常见的内分泌及代谢紊乱性疾病,胰岛素抵抗和高胰岛素血症是其重要的病理生理特征,据报道,大约 65%~80% 的瘦型和高达 90% 肥胖型多囊卵巢综合征患者可能存在胰岛素抵抗(IR)和高胰岛素血症^[1]。

排卵障碍一直被认为是 PCOS 患者不孕的原因,随着促排卵药物的应用,PCOS 患者排卵率可达 80%,但最终妊娠率只有 40%~50%,妊娠失败 > 50%,且多为早期流产^[2]。有研究认为 PCOS 所致的不孕、自然流产及复发性流产与子宫内膜胰岛素抵抗造成糖代谢异常有关^[3],子宫内膜局部糖代谢异常,造成子宫内膜的容受性缺陷,胚胎着床障碍,从而导致妊娠率低及流产率高。

目前有报道胰岛素增敏剂二甲双胍能够改善子宫内膜胰岛素抵抗的作用^[4],但长期服用二甲双胍,易出现消化道不良反应如恶心呕吐、腹泻及皮肤过敏等^[5],患者不能够坚持服用。

针灸是一种简、便、廉、验、安全无作用的传统治疗方法,有实验研究表明,针灸能纠正可能导致胰岛素抵抗各种代谢紊乱包括高血糖、肥胖、高脂血症、炎症、食欲过亢、交感神经系统的兴奋性改变和胰岛素信号缺陷^[6],有研究证明电针具有改善胰岛素抵抗或增强胰岛素敏感性的作用,电针能改善外周血胰岛素及经典靶组织肝、脂肪组织、骨骼肌、及卵巢组织敏感性^[7-9],但电针能否改善子宫内膜局部胰岛素抵抗及其机制如何,目前未有报道。

本实验旨在探讨 PCOS 大鼠模型子宫内膜是否存在胰岛素受体底物(IRS)1 和 IRS2 基因表达的改变,并应用电针进行治疗,分析其对 PCOS 大鼠模型子宫内膜 IRS1 和 IRS2 基因表达的影响及对外周胰岛素敏感性的改善作用,以期电针提高 PCOS 患者临床妊娠率、降低流产率提供实验依据。

材料与方法

1 动物 21 日龄健康雌性 SD 大鼠 30 只,体重 45~55 g,清洁级,购自广州中医药大学实验动物中心,动物合格证号为 SYXK(粤)2013-0085,动物饲养于室温(22 ± 2)℃,自由饮水和摄食。

2 主要试剂及仪器 引物合成及 Trizol(美国 Invitrogen 公司),荧光定量 PCR 试剂(德国 DBI 公司),反转录试剂盒(德国 DBI 公司),ABI9700PCR 扩增仪(美国 ABI 公司),Stratagene Mx3000P 荧光定量 PCR 仪(美国 Agilent 公司产品),罗氏 ECL 2010 电化学发光分析仪(云南乐普医疗器械有限公司),DF-23B 凝胶扫描系统(英国 UVP 公司)。

3 方法

3.1 模型制备与分组 30 只 SPF 级雌性 SD 大鼠,21 日龄按随机数字表随机分为 2 组:正常组(10 只)、造模组(20 只),造模组参照 Lai H 等^[10]方法制作 PCOS 大鼠模型,适应性喂养 3 天,至 24 日龄时颈背部皮下注射脱氢表雄酮(DHEA,美国 Sigma 公司)每天 6 mg/100 g 加 0.2 mL 麻油,连续注射 20 天,正常组(10 只)每天同期皮下注射麻油 0.2 mL 作对照。正常组喂以普通饲料,造模组喂以高脂饲料,高脂饲料购自 Research Diets,具体配方(酪蛋白 800 kcal、L-胱氨酸 12 kcal、玉米淀粉 291 kcal、麦芽糊精 400 kcal、蔗糖 691 kcal、豆油 225 kcal、猪油 1 598 kcal、复合维生素 40 kcal),大鼠第 70 日龄起,晨起行连续阴道涂片,观察动情周期,方法参考文献^[11],如造模组大鼠完全失去周期性变化,提示建模成功^[12]。至 80 日龄又随机分为模型组(10 只)、电针组(10 只)。

3.2 治疗方法 正常组和模型组:大鼠于 80 日龄起进行干预,每天只捆绑不针刺,1 周 3 次,连续 5 周;电针组:于 80 日龄起进行干预,选取中脘、关元,

双侧天枢,定位参照《实验针灸学》^[13],用 G6805 - 2A 电针仪 2 Hz 连续波输出,以局部肌肉轻度抖动无挣扎为度,电流强度在 1 mA 左右。每次针刺 30 min,每周针刺 3 天,连续 5 周。

3.3 观察项目及检测方法

3.3.1 胰岛素敏感性测定 PCOS 建模成功后(80 日龄),大鼠禁食 12 h 后,尾静脉采血,用氧化酶法测定血糖仪测定血糖(fasting blood glucose, FPG)水平,罗氏电化学发光法测定胰岛素(fasting insulin, FINS)水平(德国罗氏诊断有限公司)。采用稳态模型胰岛素抵抗(homeostasis model assessment-insulin resistance, HOMA-IR)评估胰岛素抵抗程度,计算公式如下: $HOMA-IR = FPG(mmol/L) \times FINS(mIU/L) / 22.5$ 。电针干预结束后再次测定以上指标。

3.3.2 荧光定量 PCR 法检测 IRS1、IRS2 mRNA 表达量 干预结束后,各组动物脱臼处死,取子宫内膜, -80 ℃ 冰箱保存待测。采取荧光定量 PCR 法,检测大鼠子宫组织 IRS1、IRS2 的相对表达。液氮研磨组织,用 Trizol 抽提组织样本中总 RNA,核酸胶电泳后,发现提取的 RNA 未降解,完整性较好。用 Bestar qPCR RT Kit 进行反转录,总 RNA 质量约 2 μg,从而得到反转录产物 cDNA,用 DBI Bestar SybrGreen qPCRmasterMix 进行 PCR 反应,引物序列见表 1,反应体系为 20 μL,反应扩增条件为: 94 ℃ 变性 2 min, 94 ℃ 20 s, 58 ℃ 20 s, 72 ℃ 20 s, 共 40 个循环。用 Agilent Stratagene 荧光定量 PCR 仪 Mx3000P 进行荧光定量 PCR 实验,实验按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法处理数据。其中, $\Delta Ct = (\text{目的基因 } Ct - \text{内参 } Ct)$ 的平均值 $\pm$ 标准偏差; $\Delta\Delta Ct = (\text{待测样品中目的基因 } \Delta Ct - \text{参照样品中目的基因 } \Delta Ct)$ 的平均值 $\pm$ 标准偏差(若无参照样品则选择 Ct 最大的样品为参照进行计算);相对样品初始模板量 = $(2^{-\Delta\Delta Ct})$ 的平均值 $\pm$ 标准偏差。从而统计出各 mRNA 的表达水平。

表 1 实时荧光定量 PCR 目的基因引物序列

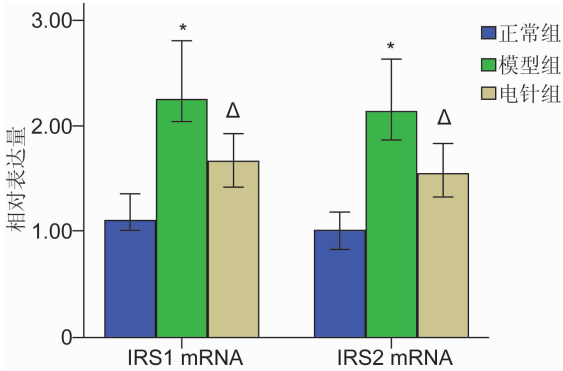
引物名称	引物序列(5'-3')	扩增长度(bp)
IRS1	F-TGCCAAATAGCCGTGGTGAT	109
	R-CCTGTCCGCATGTCAGCATA	
IRS2	F-CACAATTCCAAGCGCCACAA	189
	R-ATCAAAGCTCCAGGCTGACC	
β-actin	F-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA	150
	R-GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG	

3.4 统计学方法 运用 SPSS 17.0 统计软件包进行处理,多组样本间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 电针干预前后各组 FPG、FINS 及 HOMA-IR 比较(表 2) 各组治疗前后的 FPG 水平变化差异均无统计学意义($P > 0.05$);治疗前,模型组 FINS 水平、HOMA-IR 指数显著高于正常组($P < 0.05$);治疗后,电针组 FINS、HOMA-IR 水平显著低于模型组($P < 0.05$)。

2 各组大鼠子宫内膜 IRS2、IRS2 mRNA 相对表达量比较(图 1) 与正常组比较,模型组子宫内膜组



注:与正常组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$;每组 10 只

图 1 各组大鼠子宫内膜 IRS1、IRS2 mRNA 相对表达量比较

表 2 各组大鼠 FPG、FINS 及 HOMA-IR 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	时间	FPG (mmol/L)	FINS (mIU/L)	HOMA-IR
正常	10	治疗前	4.70 $\pm$ 0.65	10.58 $\pm$ 1.15	2.27 $\pm$ 0.25
		治疗后	4.45 $\pm$ 0.69	10.10 $\pm$ 2.28	2.40 $\pm$ 0.39
模型	10	治疗前	4.63 $\pm$ 0.76	20.86 $\pm$ 1.15 *	4.34 $\pm$ 0.52 *
		治疗后	4.41 $\pm$ 0.79	21.05 $\pm$ 2.11	4.04 $\pm$ 0.63
电针	10	治疗前	4.62 $\pm$ 0.63	20.25 $\pm$ 1.98	4.78 $\pm$ 0.69
		治疗后	4.33 $\pm$ 0.65	13.25 $\pm$ 1.70 Δ	3.09 $\pm$ 0.46 Δ

注:与正常组治疗前比较, * $P < 0.05$;与模型组治疗后比较, $\Delta P < 0.05$

织 IRS1、IRS2 mRNA 表达升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 电针组子宫内膜组织 IRS1、IRS2 mRNA 表达降低 ($P < 0.05$)。

讨 论

胰岛素与受体结合后, 信号向细胞内传递, 激活的胰岛素受体使胰岛素受体底物 1/2 (insulin receptor substrate 1/2, IRS1/2) 磷酸化, 进而激活 PI3K, 实现葡萄糖跨膜转运, 促进细胞内糖酵解、糖原合成、蛋白质合成, 抑制细胞凋亡。IRSs 是调节胰岛素信号通路的关键物质, IRS1 与 IRS2 是调节胰岛素信号传导途径的重要接头 (docking) 蛋白, IRS1 作为胰岛素受体信号转导起始的一个重要信号分子, 其蛋白表达及酪氨酸磷酸化程度的降低可引起胰岛素生物效应的减弱, 最终引起胰岛素抵抗^[14]。近年来, 国外应用基因敲除鼠及体外细胞的实验研究发现, IRS2 的缺乏可导致 PI3K 活性的降低而诱发胰岛素抵抗^[15,16]在动物和人类, 子宫内膜是代谢最活跃组织^[17], 子宫内膜含有介导胰岛素作用的所有信号蛋白和代谢酶^[18]。研究发现, PCOS 合并胰岛素抵抗患者子宫内膜组织中 IRS1 和 IRS2 蛋白的表达和酪氨酸磷酸化程度均低于健康人, 提示 PCOS 患者子宫内膜组织内存在受体后胰岛素信号传导分子的变化^[19]。

PCOS 合并胰岛素抵抗患者大部分表现为肥胖、糖尿病或糖耐量受损, 故从改善糖、肥胖入手, 本研究选用对胰岛素抵抗疾病有显著疗效的穴位进行针刺, 取穴“中脘”、“关元”、“天枢”; 中脘为胃之募穴, 胃与脾相表里, 为水谷之海; 关元是小肠募穴, 有培肾固本之功, 两穴合用具补脾肾之功。天枢穴位于神阙穴 (肚脐) 左右旁开 2 寸, 归属于胃经, 为大肠经募穴, 天枢穴常被用于治疗胃肠道的疾病, 而且从位置而言, 天枢穴位于脐旁 2 寸, 上下腹的分界处, 乃人体气机升降的枢纽, 中医学认为, 足阳明胃经在能量代谢中起着枢纽作用, 四穴合用, 能奏健脾益肾, 祛痰化湿之功效, 且以上三穴均分布于腹部, 靠近子宫, 符合直达病所, 同时在传统中医, 针刺中脘/关元穴被广泛的应用于 2 型糖尿病的治疗, 研究发现在大鼠中脘/关元穴电针后 30 min (15 Hz, 10 mA), 血糖下降^[20]。电针应用在腹部或小腿上可以明显的增加胰岛素分泌, 达到降糖作用^[21-23], 这些研究均表明, 电刺激这些穴位可增加胰岛素分泌, 降低血浆葡萄糖水平, 同样, Shapira MY 等^[24]的研究结果发现, 重复针刺腹部穴位为一段时间可通过改善胰岛素抵抗降低糖尿病动物模型血糖。因此, 本研究选择以

上三穴具有一定的理论依据。

本实验结果发现, 模型组大鼠存在 FINS、HOMA-IR 明显升高, 子宫内膜组织 IRS1、IRS2 mRNA 表达降低, 证实 PCOS 模型鼠存在胰岛素抵抗, 符合临床 PCOS 特征, 本研究发现子宫内膜 IRS1、IRS2 mRNA 表达在模型组降低, 与临床报道一致; 而电针组 FINS、HOMA-IR 降低, 子宫内膜局部 IRS1、IRS2 mRNA 的表达提高, 提示电针能够有效提高子宫内膜 IRS1 及 IRS2 基因的表达, 改善外周胰岛素敏感性, 促进葡萄糖利用, 这可能是其改善机体胰岛素抵抗机制之一。电针的具体作用靶点仍将深入研究, 本治疗方法有望成为提高 PCOS 患者妊娠率, 减少流产率的一条新的治疗途径。

参 考 文 献

- [1] DeUgarte CM, Bartolucci AA, Azziz R. Prevalence of insulin resistance in the polycystic ovary syndrome using the homeostasis model assessment [J]. *Fertil Steril*, 2005, 83(5): 1454 - 1460.
- [2] Arredondo F, Noble LS. Endocrinology of recurrent pregnancy loss [J]. *Semin Reprod Med*, 2006, 24(1): 33 - 39.
- [3] Schulte MM, Tsai JH, Moley KH. Obesity and PCOS: The effect of metabolic derangements on endometrial receptivity at the time of implantation [J]. *Reprod Sci*, 2011, 22(1): 6 - 14.
- [4] 翟军, 孙莹璞, 刘春喜, 等. 二甲双胍治疗对 PCOS 患者子宫内膜胰岛素抵抗的影响 [J]. *河南医学研究*, 2012, 21(1): 26 - 31.
- [5] 郝鑫菊, 罗艳, 刘京伟, 等. 二甲双胍不良反应及合理用药 [J]. *河北医药*, 2016, 38(4): 603 - 606.
- [6] Liang F, Koya D. Acupuncture: is it effective for treatment of insulin resistance? [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2010, 12(7): 555 - 569.
- [7] Manneras L, Jonsdottir IH, Holmang A, et al. Low-frequency electro-acupuncture and physical exercise improve metabolic disturbances and modulate gene expression in adipose tissue in rats with dihydrotestosterone-induced polycystic ovary syndrome [J]. *Endocrinology*, 2008, 149(7): 3559 - 3568.
- [8] Ishizaki N, Okushi N, Yano T, et al. Improvement in glucose tolerance as a result of enhanced insulin sensitivity during electroacupuncture in spontaneously diabetic Goto-Kakizaki rats [J]. *Metabolism*, 2009, 58(10): 1372 - 1378.
- [9] Johansson J, Feng Y, Shao R, et al. Intense

- electroacupuncture normalizes insulin sensitivity, increases muscle GLUT4 content, and improves lipid profile in a rat model of polycystic ovary syndrome [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010, 299(4): E551 – E559.
- [10] Lai H, Jia X, Yu Q, et al. High-fat diet induces significant metabolic disorders in a mouse model of polycystic ovary syndrome [J]. *Biol Reprod*. 2014, 91(5): 127.
- [11] Zhang S. Vaginal cell changes observed in estrous cycle of rats [J]. *Prog Vet Med*, 2006, 27(2): 69 – 72.
- [12] 谢阳, 黄冬梅, 李琼, 等. 一种新的胰岛素抵抗的多囊卵巢综合征大鼠模型的建立 [J]. *生殖医学杂志*, 2009, 18(5): 466 – 470.
- [13] 张露芬主编. 实验针灸学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 221 – 223.
- [14] Van Eijk M, Aten J, Bijl N, et al. Reducing glycosphingolipid content in adipose tissue of obese mice restores insulin sensitivity, adipogenesis and reduces inflammation [J]. *PLoS One*, 2009, 4(3): 4723.
- [15] Shimomura I, Matsuda M, Hammer RE, et al. Decreased IRS-2 and increased SREBP-1 c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice [J]. *Mol Cell*, 2000, 6(1): 77 – 86.
- [16] Burks DJ, Font de Mora J, Schubert M, et al. IRS-2 pathways integrate female reproduction and energy homeostasis [J]. *Nature*, 2000, 407(6802): 377 – 382.
- [17] Ferenczy A, Bergeron C. Histology of the human endometrium: from birth to senescence [J]. *Ann N Y Acad Sci USA*, 1991, 622(1): 6 – 27.
- [18] Strowitzki T, Capp E, von Wolff M, et al. Expression of glucose transporter 1 in human endometrial and decidual tissue [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2001, 15(2): 219 – 224.
- [19] 盛慧, 刘义, 吕立群, 等. 多囊卵巢综合征患者子宫内膜胰岛素抵抗的分子机制 [J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2010, 39(4): 457 – 460.
- [20] Chang SL, Lin JG, Chi TC, et al. An insulin-dependent hypoglycaemia induced by electroacupuncture at Zhongwan (CV12) acupoint in diabetic rats [J]. *Diabetologia*, 1999, 42(2): 250 – 255.
- [21] Lin JG, Chang SL, Cheng JT. Release of β -endorphin from adrenal gland to lower plasma glucose by electroacupuncture at Zhongwan acupoint in rats [J]. *Neurosci Lett*, 2002, 326(1): 17 – 20.
- [22] Lin JG, Chen WC, Hsieh CL. Multiple sources of endogenous opioid peptide involved in the hypoglycemic response to 15 Hz electroacupuncture at Zhongwan acupoint in rats [J]. *Neurosci Lett*, 2004, 366(1): 39 – 42.
- [23] Chang SL, Tsai CC, Lin JG, et al. Involvement of serotonin in the hypoglycemic response to 2 Hz electroacupuncture of Zusanli acupoint (ST36) in rats [J]. *Neurosci Lett*, 2005, 379(1): 69 – 73.
- [24] Shapira MY, Appelbaum EY, Hirshberg B, et al. A sustained, non-insulin related, hypoglycaemic effect of electroacupuncture in diabetic *Psammomys obesus* [J]. *Diabetologia*, 2000, 43(60): 809 – 813.

(收稿: 2016-01-03 修回: 2016-05-28)