

研究论文

二甲双胍改善多囊卵巢综合征并激活雌性生殖干细胞

王春红^{1,2}, 王强强^{1,2}, 苏亚珊¹, 孙亚群¹, 孙苗¹, 刘心蕊¹, 马会明¹, 李广永³, 杜小利^{2,*}, 何瑞^{1,2,*}宁夏医科大学¹基础医学院, 生育力保持教育部重点实验室; ²中医学学院, 回医药现代化教育部重点实验室; ³总医院泌尿外科, 银川 750004

摘要: 多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)是生育年龄妇女常见的一种复杂的内分泌及代谢异常所致的疾病, 是女性不孕的重要因素。二甲双胍是临床应用最广泛的经典口服降糖药物, 近年来被应用于PCOS治疗, 但其作用机制尚不明确。本研究通过建立小鼠PCOS模型, 论证二甲双胍对PCOS的改善作用及其机制。4~5周龄雌性C57BL/6J小鼠连续21天给予来曲唑(每天灌胃1 mg/kg)联合高脂饮食, 建立PCOS模型。成模后灌胃给予二甲双胍(每天200 mg/kg), 1个月后取材, 期间检测体重并进行糖耐量试验。取材后行苏木素-伊红(H&E)染色检测卵巢病理改变; ELISA法测定血清中抗缪勒氏管激素(anti-Mullerian hormone, AMH)、卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone, FSH)、黄体生成素(luteinizing hormone, LH)、雌二醇(E₂)、睾酮等激素水平; 免疫组织化学及免疫荧光染色法检测雌性生殖干细胞(female germline stem cells, FGSCs)标志物DDX4/MVH及PCNA表达及定位; Western blot检测小鼠卵巢中DDX4/MVH、PCNA、cyclin D2以及AMPK/mTOR通路蛋白。结果显示, PCOS小鼠在接受二甲双胍治疗后, 体重逐渐恢复正常, 糖耐量试验显示糖耐量明显改善, 血清E₂水平升高, AMH、LH、睾酮水平及LH/FSH比值下降, 卵巢多囊病变减轻, 闭锁卵泡减少, 且具有增殖性的FGSCs数目明显增多, 卵巢组织PCNA、cyclin D2等增殖相关蛋白增加, p-mTOR、p-AMPK等蛋白明显上调。以上结果提示, 二甲双胍在改善PCOS高雄激素血症、糖耐量异常及卵巢多囊病变的同时, 还可以促进FGSCs增殖并激活其功能, 其作用可能与AMPK、mTOR磷酸化有关。这些发现为二甲双胍治疗PCOS以及改善卵泡发育提供了新的科学依据和方向。

关键词: 二甲双胍; 多囊卵巢综合征; 雌性生殖干细胞; AMPK/mTOR

Metformin improves polycystic ovary syndrome and activates female germline stem cells in mice

WANG Chun-Hong^{1,2}, WANG Qiang-Qiang^{1,2}, SU Ya-Shan¹, SUN Ya-Qun¹, SUN Miao¹, LIU Xin-Rui¹, MA Hui-Ming¹, LI Guang-Yong³, DU Xiao-Li^{2,*}, HE Rui^{1,2,*}

¹Key Laboratory of Fertility Maintenance, Ministry of Education, Basic Medical College; ²College of Traditional Chinese Medicine, Key Laboratory of Hui Medicine Modernization, Ministry of Education; ³Urology Department of General Hospital, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China

Abstract: Polycystic ovary syndrome (PCOS) is a common disease caused by complex endocrine and metabolic abnormalities in women of childbearing age. Metformin is the most widely used oral hypoglycemic drug in clinic. In recent years, metformin has been used in the treatment of PCOS, but its mechanism is not clear. In this study, we aimed to investigate the effect of metformin on PCOS and its mechanism through PCOS mouse model. Female C57BL/6J mice aged 4–5 weeks were intragastrically given letrozole (1 mg/kg daily) combined with a high-fat diet (HFD) for 21 days to establish the PCOS model. After modeling, metformin (200 mg/kg daily)

This work was supported by Ningxia Excellent Young Teachers Training Fund Project (No. NGY2018-74), the Key Research and Development Projects in Ningxia (No. 2020BFG02010), the National Natural Science Foundation of China (No. 31860290, 81860268), Ningxia Science and Technology Innovation Leading Talent Training Project (No. 2020GKLRX11) and Ningxia Medical University Research Project (No. XT2019017).

*Corresponding authors. HE Rui: E-mail: ruihe515@163.com; DU Xiao-Li: E-mail: dxl_515@163.com

was intragastrically administered. One month later, the body weight and oral glucose tolerance test (OGTT) were measured. Hematoxylin eosin (H&E) staining was used to detect the pathological changes of ovary. The serum levels of anti-Mullerian hormone (AMH), follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), E_2 and testosterone (T) were measured by ELISA. The expression of DDX4/MVH was detected by immunohistochemistry. DDX4/MVH and PCNA were co-labeled by immunofluorescence. The protein levels of DDX4/MVH, PCNA, cyclin D2, AMPK and mTOR were detected by Western blot. The results showed that after metformin treatment, the body weights of PCOS mice were gradually returned to normal, glucose tolerance was significantly improved, serum E_2 levels were increased, while AMH, LH, T levels and LH/FSH ratio were decreased. Ovarian polycystic lesions were reduced with reduced atresia follicles. Furthermore, the number of proliferative female germline stem cells (FGSCs) and levels of proliferation related proteins (PCNA, cyclin D2) were significantly increased, and the p-mTOR and p-AMPK levels were markedly up-regulated. These results suggest that metformin treatment not only improves hyperandrogenemia, glucose intolerance and polycystic ovarian lesions in PCOS, but also activates the function of FGSCs. The underlying mechanism may be related to the phosphorylation of AMPK and mTOR. These findings provide new evidence to use metformin in the treatment of PCOS and follicular development disorder.

Key words: metformin; polycystic ovary syndrome; female germline stem cells; AMPK/mTOR

多囊卵巢综合征 (polycystic ovarian syndrome, PCOS) 是生育年龄妇女常见的一种复杂的内分泌及代谢异常所致的疾病, 会导致月经不调、排卵障碍甚至不孕, 也可以发生糖尿病、心血管疾病、子宫内膜增生及子宫内膜癌等并发症, 严重影响育龄女性的心理健康及生活质量。代谢异常被认为是PCOS发生和发展中的核心因素, 胰岛素致敏剂已被提出作为一种可行的PCOS治疗方案^[1]。近年来, 临床上已将二甲双胍作为治疗PCOS伴随代谢异常的常用处方药, 取得良好治疗效果, 但其作用机制尚不明确。

干细胞是理想的种子细胞, 具有自我更新和多重分化的潜力, 在维持机体稳态、细胞再生和修复方面起着基础性作用。雌性生殖干细胞 (female germline stem cells, FGSCs) 作为一种新发现的干细胞类型, 可分化为卵母细胞, 并能促进卵泡更新, 已被证明存在于卵巢表面上皮中, 并成功从出生后哺乳动物卵巢中分离出FGSCs^[2-4], 打破了传统卵泡“固有论”。Wu等人^[2, 5]发现卵巢早衰的不育小鼠, 在移植FGSCs后, 可恢复各阶段的卵泡, 并产生健康的后代。因此, FGSCs的增殖能力有助于维持卵泡发育和延长生殖周期。但二甲双胍与FGSCs的关系鲜有研究报道。

本研究通过采用高脂喂养及来曲唑诱导的肥胖、糖耐量异常且雄激素增高、排卵障碍的小鼠PCOS模型, 给予二甲双胍进行治疗, 探讨其对PCOS的改善作用及机制, 从而为二甲双胍治疗PCOS以及改善卵泡发育障碍性疾病提供新的科学实验依据及思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF级雌性C57BL/6J小鼠, 4~5周龄, 体重约20 g, 购自宁夏医科大学动物中心 (No. 10752309202000082), 保证小鼠可自由摄食饮水, 恒温18~22 °C, 相对湿度60%~80%。适应性饲养7天后, 选择有4~5天规则且连续动情周期的18只小鼠纳入本实验, 为防止实验出现偶然性, 第一批实验结束后, 重复实验两次。

1.1.2 主要试剂 BCA蛋白定量试剂盒购自凯基生物公司, Western blot试剂购自碧云天生物技术研究; 山羊抗小鼠、山羊抗兔IgG (中杉金桥), 荧光二抗购自中国Abbkine公司; 鼠抗 β -actin抗体购自SANTA CRUZ公司; 兔抗DDX4/MVH、兔抗PCNA抗体均购自Abcam公司; 鼠抗PCNA抗体购自中国Abbkine公司; 兔抗mTOR、兔抗p-mTOR、兔抗AMPK、兔抗p-AMPK、兔抗cyclin D2抗体均购自Cell Signaling公司, 来曲唑片 (江苏恒瑞医药股份有限公司, 规格2.5 mg)、盐酸二甲双胍片 (中美上海施贵宝制药有限公司, 规格0.5 g) 均购自宁夏医科大学附属总医院。

1.1.3 主要仪器 Leica 双目正置荧光显微镜; BX-51正置荧光显微镜 (OLYMPUS日本); GelDoc XR System化学发光凝胶成像系统购自美国Bio-Rad仪器公司。

1.2 方法

1.2.1 PCOS小鼠的模型建立及治疗 高脂饲料 (45% fat, D12451; Research Diets, USA) 喂养加灌胃给予来曲唑 (每天1 mg/kg), 连续21天可以建立胰岛

素抵抗及高雄激素血症的PCOS模型^[6], 将造模成功后的小鼠随机分为PCOS模型组和二甲双胍组($n = 6$), 并设立正常组, 普通饲料常规喂养, 不造模。正常组继续普通饲料喂养, 给予等剂量的生理盐水, 其余两组持续高脂饲料喂养和灌胃给予来曲唑(每天1 mg/kg), 同时, 二甲双胍组给予二甲双胍灌胃(每天200 mg/kg), PCOS模型组给予同剂量的生理盐水。1个月取材, 收集血清用于激素检测; 取小鼠卵巢, 一侧常规石蜡包埋, 用于组织学检查; 另一侧保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱, 用于分子生物学实验研究。

1.2.2 阴道分泌物涂片用于动情周期测定 用滴管吸取适量生理盐水, 在同一时间点冲洗、吸取阴道分泌物于载玻片上, 行苏木素-伊红(H&E)染色, 在显微镜下观察细胞形态, 判断动情周期。取材前连续7天检测动情周期。

1.2.3 口服葡萄糖耐量试验(oral glucose tolerance test, OGTT) 在造模第20天及治疗第27天进行OGTT。方法: 禁食14~16 h, 灌葡萄糖前测体重, 分别在口服葡萄糖后0、15、30、60、90、120 min测血糖。

1.2.4 ELISA法检测血清激素水平 采用ELISA法检测各血清样品中抗缪勒氏管激素(anti-Mullerian hormone, AMH)、卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone, FSH)、黄体生成素(luteinizing hormone, LH)、雌二醇(E_2)、睾酮等含量, 操作严格按照试剂盒说明书要求进行。

1.2.5 组织形态学检测 H&E染色、免疫组织化学染色、免疫荧光染色常规操作按照说明书要求进行, 镜下观察, 拍照保存。其中免疫组织化学染色中兔抗DDX4/MVH抗体按1:1 000稀释; 免疫荧光染色中抗体稀释倍数: 兔抗DDX4/MVH抗体(1:400)、鼠抗PCNA抗体(1:200), 相应荧光二抗(1:300)。

1.2.6 Western blot检测DDX4/MVH、PCNA、cyclin D2、AMPK、p-AMPK、mTOR、p-mTOR蛋白的表达 提取卵巢组织蛋白, BCA试剂盒定量, 上样, 电泳, 200 mA电转2 h, 5%牛奶封闭1 h, 相应一抗(除 β -actin抗体稀释倍数为1:2 000、PCNA抗体稀释倍数1:4 000外, 其余所用抗体稀释倍数均为1:1 000) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 次日, 孵育相应二抗, 室温1 h, 洗膜后加入显色液上机曝光, 用ImageJ图像分析软件测定各条带灰度值。

1.2.7 统计学分析 运用Prism 8.0统计分析软件对所得数据进行统计, 计量资料用 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示。

多个样本均数间比较采用完全随机设计资料的双因素方差分析(two-way ANOVA), 组间两两比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 二甲双胍改善高脂喂养联合来曲唑灌胃造成的小鼠肥胖、糖耐量异常表型

高脂喂养联合来曲唑灌胃建立PCOS模型, 通过测量小鼠体重并计算体重变化, 即(末体重 - 初体重)/初体重, 证明PCOS模型组小鼠体重变化明显高于正常组(图1A), OGTT显示糖耐量明显受损(图1B)。但在给予二甲双胍治疗后, 与PCOS模型组相比, 体重变化显著下降(图1A), OGTT显示二甲双胍治疗组血糖值在给糖后第60 min、120 min均显著低于PCOS模型组, 与正常组相近(图1C), 通过计算每组曲线下面积(area under the curve, AUC), 得到AUC柱状图(图1D、E), 结果亦显示二甲双胍组血糖比PCOS组有明显改善。

2.2 二甲双胍改善高脂喂养联合来曲唑灌胃造成的小鼠高雄激素血症及雌激素紊乱

检测血清激素水平, 与正常组小鼠相比, PCOS模型组小鼠血清睾酮、LH、AMH水平及LH/FSH比值明显增高(图2A、C、E、F), E_2 水平明显降低(图2B), 而经二甲双胍干预后, 血清睾酮、LH、AMH水平及LH/FSH比值显著降低, E_2 水平显著增高(图2)。

2.3 二甲双胍改善PCOS小鼠卵巢功能和形态

小鼠的动情周期类似人的月经周期, 反映卵巢排卵功能及内分泌功能。根据阴道分泌物涂片观测的细胞种类和形态, 小鼠动情周期分为动情前期、动情期、动情后期及动情间期(图3A)。在二甲双胍治疗后, 我们通过小鼠阴道涂片持续每天检测动情周期, 发现正常组小鼠动情周期规则, 呈现动情前期、动情期、动情后期、动情间期交替, 4~5天为一周期且规律出现。PCOS模型组阴道涂片持续见大量白细胞, 仅见极少量梭形上皮细胞, 失去正常动情周期而处在持续间期。二甲双胍组在治疗前同模型组, 处于持续间期, 但是给予治疗后, 逐步出现动情前期、动情期、动情后期, 直至取材前恢复正常规律动情周期(图3B)。由此可见, 二甲双胍组可以明显改善小鼠的动情周期。

进一步进行卵巢形态学观察, H&E染色(图4A)结果显示: 正常小鼠卵巢可见多个不同发育阶

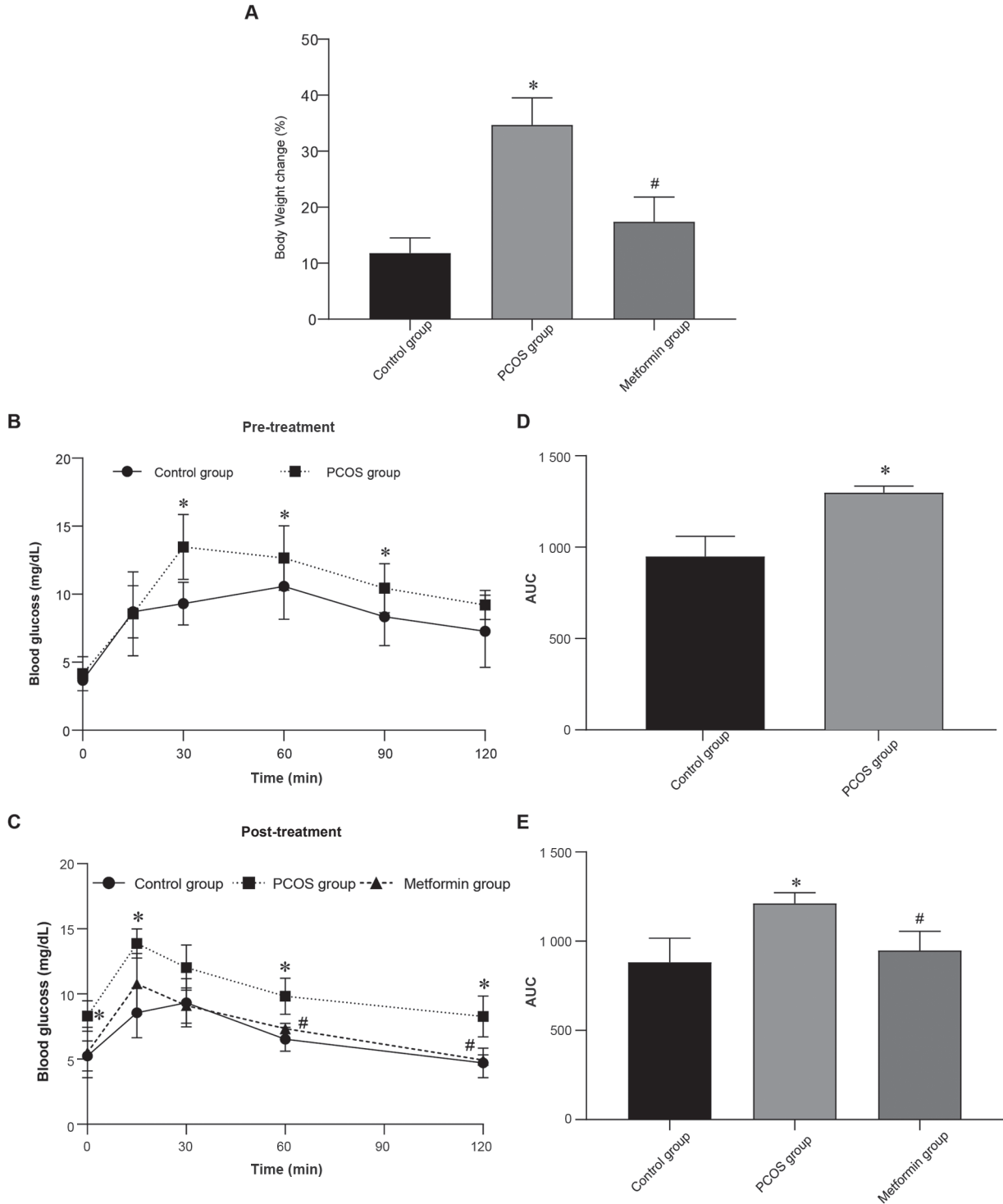


图 1. 二甲双胍对PCOS模型小鼠体重及糖耐量试验的影响

Fig. 1. Effect of metformin on body weight and oral glucose tolerance test (OGTT). A: Body mass index. B: OGTT before treatment (the model group and metformin group were the same group before treatment). C: OGTT after treatment. D: Area under the curve (AUC) of OGTT before treatment. E: AUC of OGTT after treatment. * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs PCOS group. Mean \pm SEM, $n = 6$.

段的卵泡及黄体，颗粒细胞形态完整且排列整齐；PCOS模型组小鼠卵巢表现为多个空腔卵泡、颗粒层稀疏，多数卵泡闭锁；二甲双胍治疗组小鼠卵巢

闭锁卵泡的数量显著减少，卵巢内均可见多个发育不同阶段的卵泡，接近成熟期的卵泡，可见卵母细胞及放射冠，颗粒细胞层增厚并紧密聚集，形态接

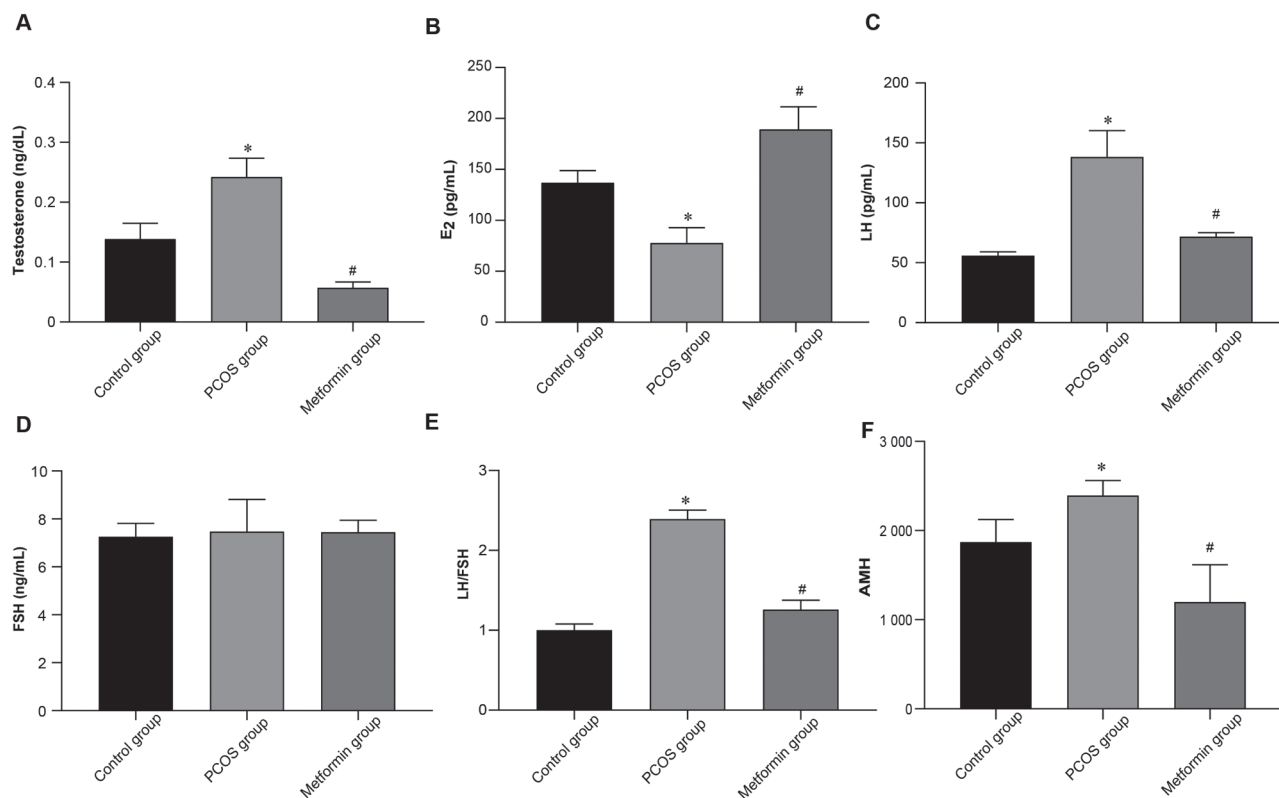


图 2. 二甲双胍对PCOS模型小鼠血清激素水平的影响

Fig. 2. Effect of metformin on hormones. A: Testosterone levels. B: Estradiol (E₂) level. C: Luteinizing hormone (LH) levels. D: Follicle-stimulating hormone (FSH) level. E: LH/FSH. F: Anti-Mullerian hormone (AMH) level. **P* < 0.05 vs control group; #*P* < 0.05 vs PCOS group. Mean ± SEM, *n* = 6.

近正常组。

卵泡计数 (图 4B) 结果显示: PCOS 模型组相对于正常组小鼠, 闭锁卵泡明显增多, 而原始卵泡、初级卵泡、次级卵泡以及成熟卵泡明显减少, 而二甲双胍组闭锁卵泡明显减少, 其他各级卵泡增多。

以上结果表明: 二甲双胍可明显恢复 PCOS 小鼠的动情周期, 改善 PCOS 小鼠卵巢病理性多囊, 改善卵巢功能。

2.4 二甲双胍激活FGSCs并促进其增殖

DDX4/MVH 是 FGSCs 的特异性标记物。免疫组织化学染色显示各组小鼠卵巢组织 DDX4/MVH 均呈阳性表达 (图 5A 箭头处所示), 分布在卵巢皮质层, 证明了 FGSCs 的存在; 为了进一步确定 FGSCs 的数量以及增殖性, 我们通过免疫荧光染色法对 MVH/DDX4、PCNA 进行共标 (图 5B)。PCNA 是增殖细胞核抗原, 是反映细胞增殖的重要指标, 如图 5B 所示, 绿色荧光 (箭头处) 为 DDX4/MVH 阳性表达, 提示该细胞为 FGSCs, 红色荧光 (箭头处) 为 PCNA 阳性表达, 提示该细胞具有增殖活力。可

以看出, 各组小鼠卵巢组织均存在 FGSCs, 尤其二甲双胍治疗组 FGSCs 数量明显增加 (图 5C), 成簇表达, PCNA 染色阳性, 表明具有增殖活性。PCOS 模型组虽然存在少量 FGSCs, 但大多无 PCNA 阳性表达, 表明这些细胞无增殖性。

Western blot 结果也显示, 二甲双胍组 FGSCs 特异性蛋白 DDX4/MVH、细胞增殖蛋白 PCNA 及 cyclin D2 表达明显比模型组增多 (图 6), 进一步证明二甲双胍可以激活 FGSCs, 并促进其增殖。

2.5 二甲双胍可能通过促进AMPK、mTOR磷酸化改善PCOS

我们通过 Western blot 进一步探究其机制, 结果显示, 与 PCOS 模型组小鼠相比, 正常组及二甲双胍组中 p-AMPK、p-mTOR 蛋白上调 (图 7), 表明二甲双胍可能通过促进 AMPK/mTOR 磷酸化改善 PCOS。

3 讨论

科学研究和临床证据均表明^[7], PCOS 可伴有

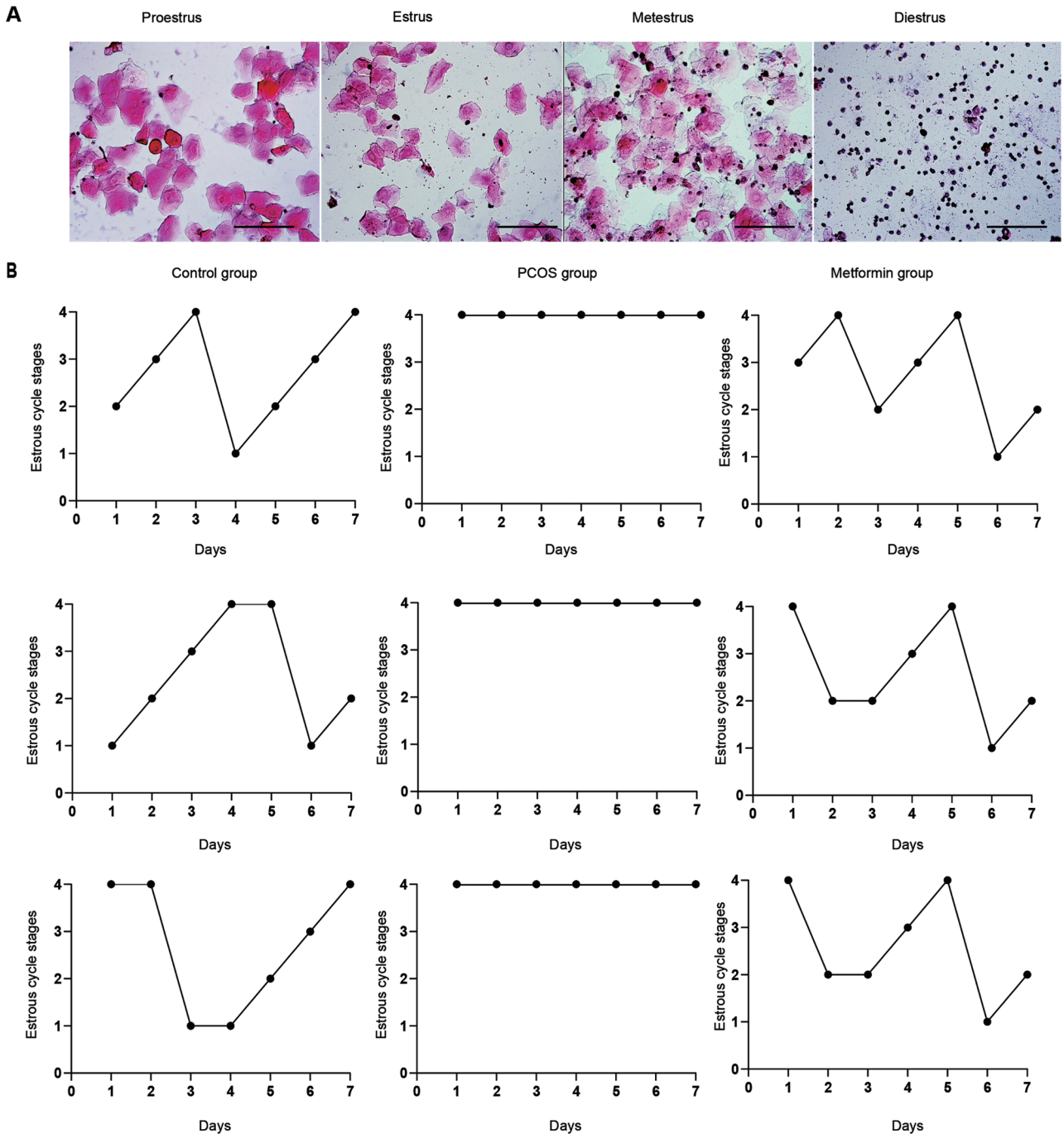


图 3. 二甲双胍对小鼠动情周期的影响

Fig. 3. Effects of metformin on estrous cycle of mice. A: H&E staining of estrous cycle. Scale bar, 100 μ m. B: Estrous cycle changes in three representative mice from each group during seven days before the mice were killed. The ordinates are as follows: 1, proestrus; 2, estrus; 3, metestrus; and 4, diestrus. Abscissa is seven days before the mice were killed.

肥胖、胰岛素抵抗、代偿性高胰岛素血症、葡萄糖耐受不良、脂质异常等一系列代谢异常特征，而糖脂代谢紊乱反过来会促进 PCOS 病情进展。因此，二甲双胍作为经典降糖药物，已经成为临床用于治疗 PCOS 的常用处方药，其作用机制也在不断被研

究和发掘。

在本研究中，我们采用经典的 PCOS 动物模型，通过对小鼠进行高脂喂养，造成肥胖及糖耐量异常，灌胃给予来曲唑，造成高雄激素血症，建立 PCOS 模型^[6]。造模成功后，PCOS 模型小鼠表现出肥胖、

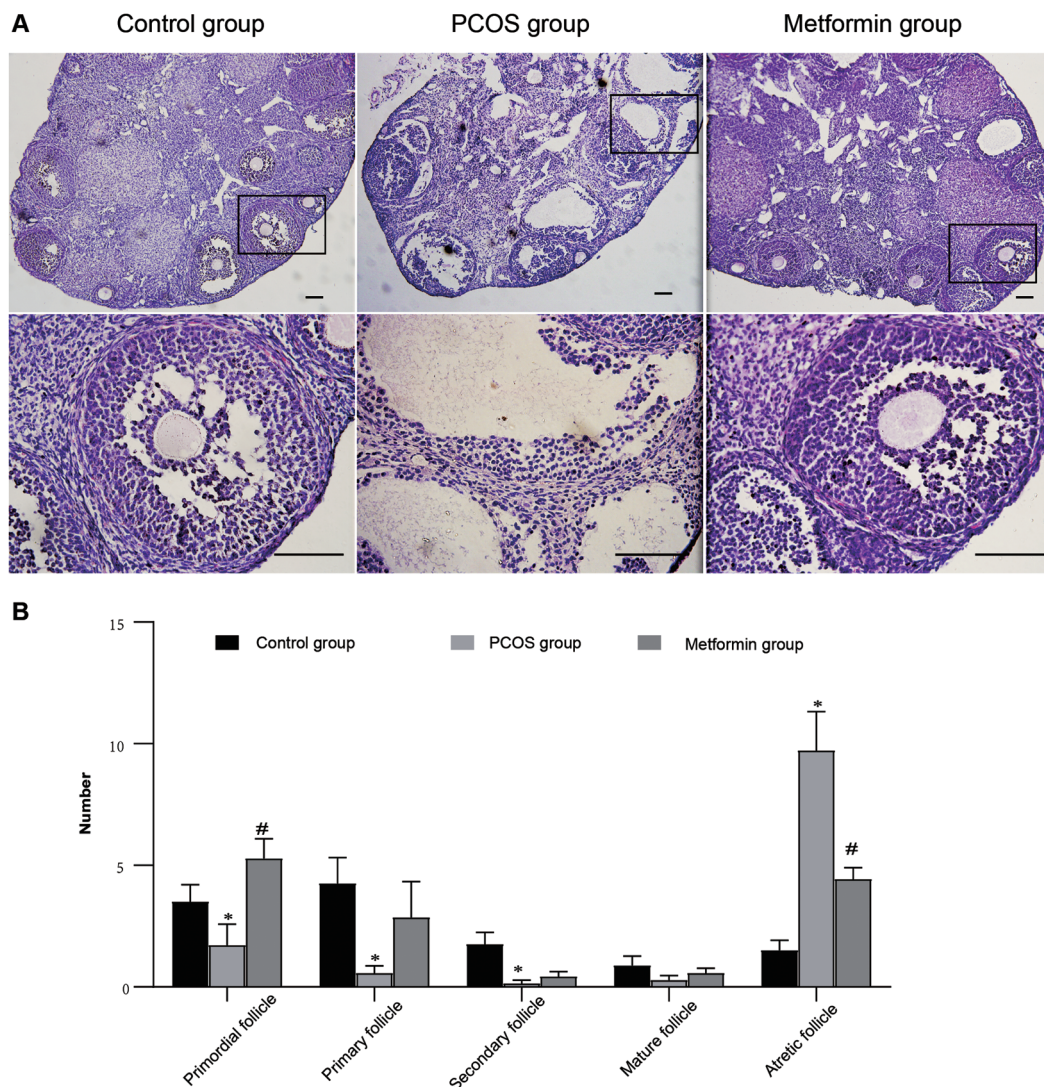


图 4. 二甲双胍对卵巢形态的影响

Fig. 4. Effects of metformin on ovarian morphology. A: H&E staining of ovarian tissue. Scale bar, 100 μ m. B: Follicle counts at all levels, i.e. primordial follicle, primary follicle, secondary follicle, mature follicle and atretic follicle from left to right. * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs PCOS group. Mean \pm SEM, $n = 6$.

糖耐量异常、高雄激素血症及雌激素紊乱，并且出现动情周期紊乱、排卵障碍、卵巢功能障碍等生殖障碍表型。高 LH/FSH 比值是 PCOS 的典型特征之一^[8]。高 LH 会抑制 FSH 功能，使颗粒细胞黄素化，小窦卵泡发育停止，卵巢多囊。本研究结果也验证了二甲双胍可以调节 LH/FSH 稳态，改善卵泡发育异常和颗粒细胞状态。AMH 显示卵巢储备功能，多项研究表明 PCOS 患者血清中会产生大量的 AMH^[9-12]，AMH 水平能够反映 PCOS 的严重程度，可作为临床诊断、预测 PCOS 的重要参考指标。本研究血清 AMH 检测结果亦显示，正常组有 AMH 表达，但表达量不高，PCOS 模型组 AMH 显著升高，

与文献报道一致，而给予二甲双胍组治疗后，血清中 AMH 明显降低，接近正常水平。而且，本研究结果还显示，在二甲双胍干预后，PCOS 小鼠肥胖、胰岛素抵抗、葡萄糖耐量受损等代谢紊乱症状都有明显改善，高雄激素血症、雌激素等激素紊乱也逐渐恢复稳态，进而促使卵泡发育恢复正常，排卵周期重新启动，综合有效改善 PCOS。但二甲双胍调节卵泡发育和颗粒细胞功能的机制尚不清楚。

在此基础上，我们进一步探究二甲双胍发挥作用的机制，发现 PCOS 模型小鼠 mTOR、AMPK 磷酸化下调，而二甲双胍能够促进 mTOR、AMPK 磷酸化。AMPK 是调节糖脂代谢的主要传感器，

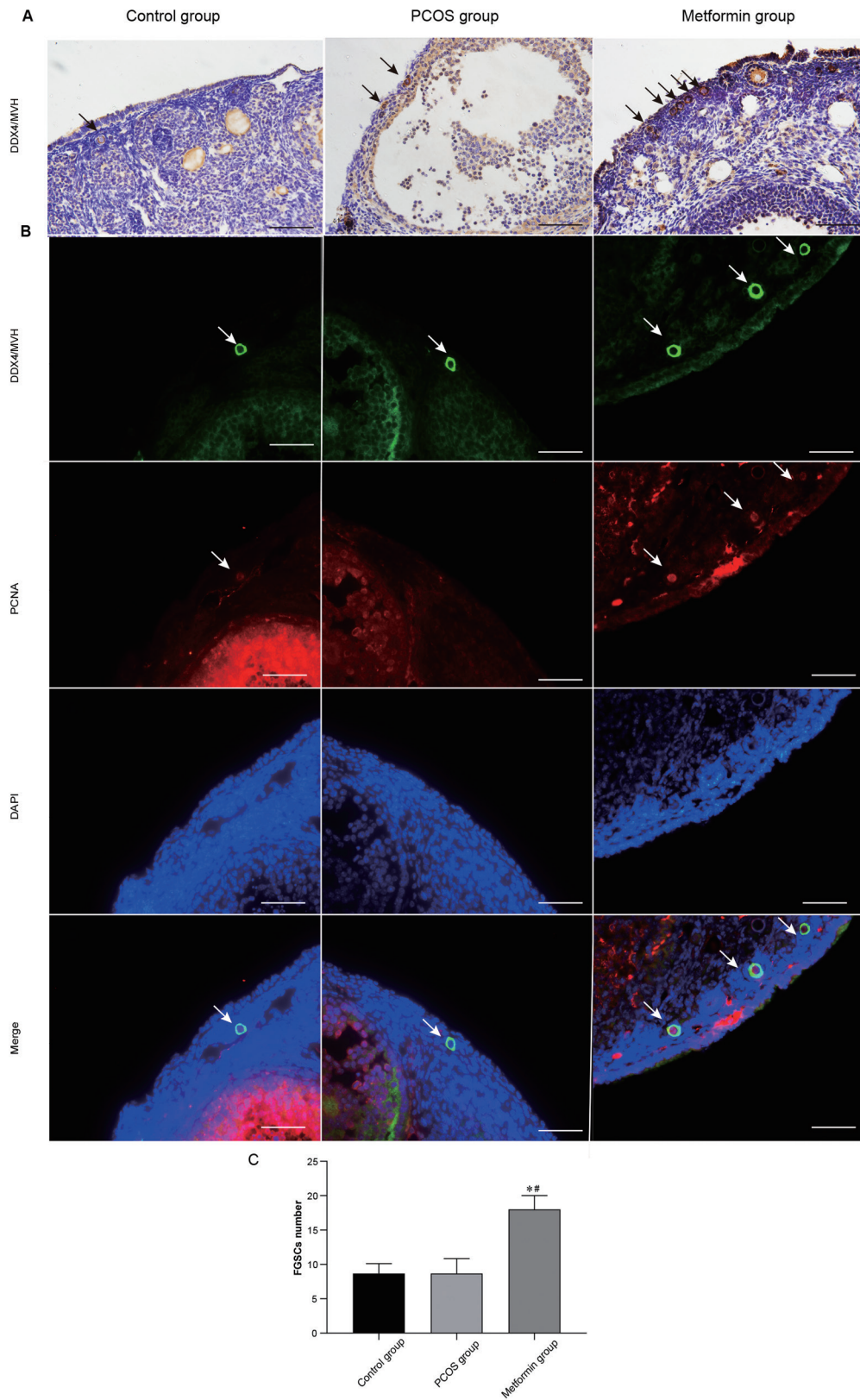


图 5. 免疫组织化学法及免疫荧光法检测二甲双胍对雌性生殖干细胞的影响

Fig. 5. Effects of metformin on female germline stem cells (FGSCs) were detected by immunohistochemistry and immunofluorescence. *A*: Immunohistochemistry staining of DDX4/MVH. The black arrows show the DDX4/MVH-positive cells. *B*: Immunofluorescence staining of DDX4/MVH and PCNA. The white arrows show the DDX4/MVH- and PCNA- positive cells, Scale bar, 100 μ m. *C*: Statistics of the number of FGSCs in *B*. Mean \pm SEM, $n = 3$. * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs PCOS group.

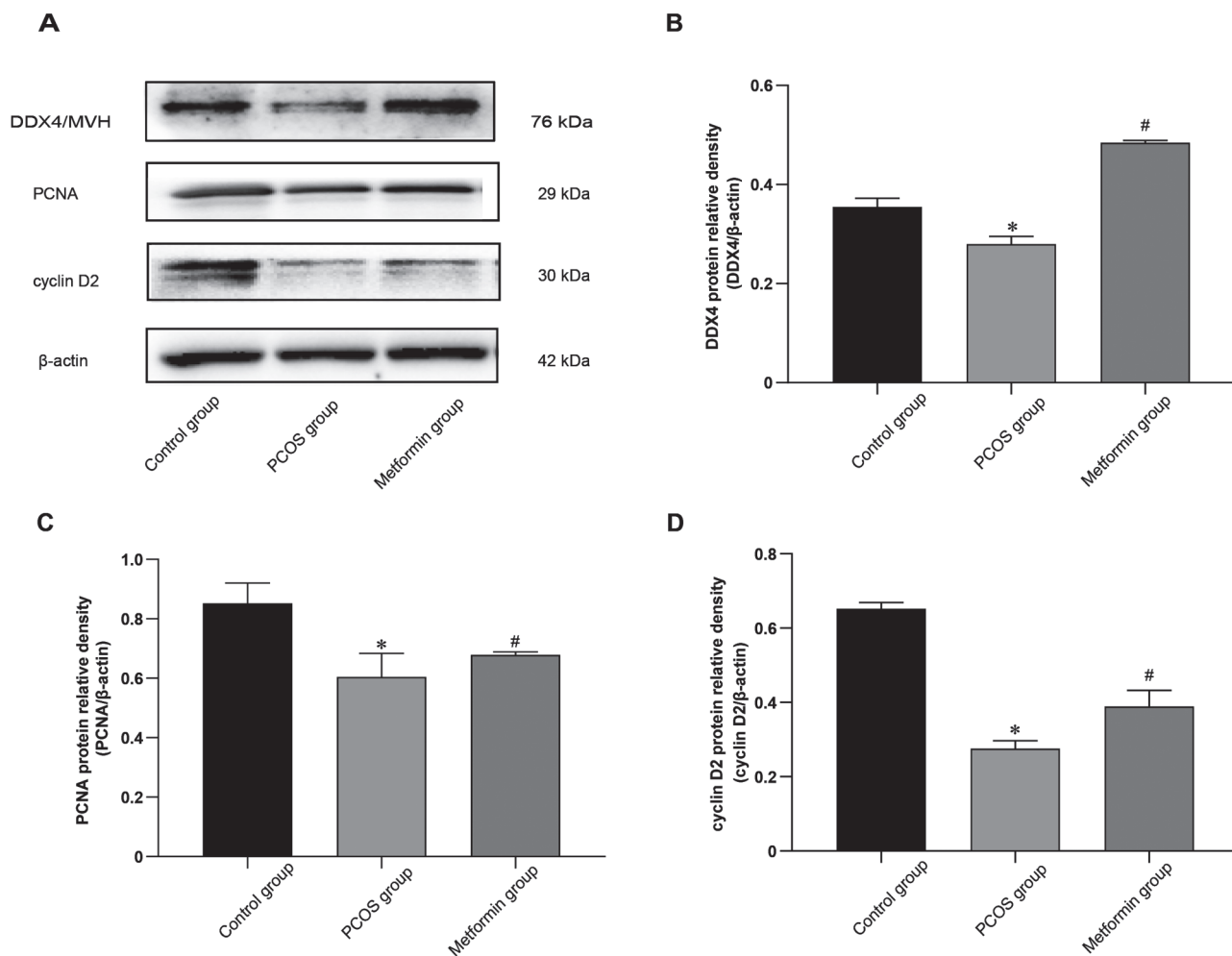


图 6. Western blot法检测二甲双胍对雌性生殖干细胞的影响

Fig. 6. Effects of metformin on FGSCs were detected by Western blot. A: Western blot of DDX4/MVH, PCNA, and cyclin D2. B–D: DDX4/MVH, PCNA, and cyclin D2 protein relative density. * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs PCOS group. Mean \pm SEM, $n = 3$.

mTOR 是 AMPK 的下游靶点之一，是细胞增殖的控制中心。已有文献报道^[13, 14]，mTOR 信号通路参与 PCOS 的发生和发展，调控细胞生长和增殖，介导原始卵泡激活，在卵泡生长发育中发挥着重要的作用^[15]。而且 p-mTOR 下调被认为是 PCOS 发生的关键因素^[16]。mTOR/AMPK 通路在代谢中起着关键性作用^[17]，而高雄激素血症和胰岛素抵抗更是 PCOS 的两大主要特征。因此，我们推测二甲双胍可能通过促进 AMPK/mTOR 磷酸化改善 PCOS。

本研究的另一重要发现是：二甲双胍可以激活 FGSCs。免疫组织化学和免疫荧光染色结果均证实，给予二甲双胍治疗后，卵巢形态恢复正常，卵泡发育正常，且具增殖活力的 FGSCs 出现，并激活 FGSCs 增殖。PCOS 引起的不孕症主要机理是卵泡发育障碍及排卵障碍。FGSCs 的存在已逐渐得到

生殖研究领域的认可，而 FGSCs 的耗竭导致卵母细胞数量减少和卵巢功能障碍。有研究揭示了 FGSCs 分化^[5, 18]、增殖^[19–21]的调控机制，这些机制被认为是女性生育的关键，且证实 FGSCs 的增殖能力受微环境控制^[22]。而 PCOS 是否影响 FGSCs，鲜有报道。本研究结果显示，PCOS 模型小鼠虽然存在一定数量的 FGSCs，但是缺乏增殖能力。而给予二甲双胍治疗后，FGSCs 数量明显增加，且具有增殖能力。Western blot 结果显示，二甲双胍治疗组小鼠 FGSCs 特异性标记物 DDX4/MVH 蛋白及细胞增殖蛋白 PCNA、cyclin D2 明显上调，进一步证实二甲双胍能激活 FGSCs 并促进其增殖。该发现为促进卵母细胞再生、补充卵泡池，从而增加妊娠率提出了新的研究方向，但深入机制需要进一步研究。

总之，本研究通过 PCOS 动物模型，证实了二

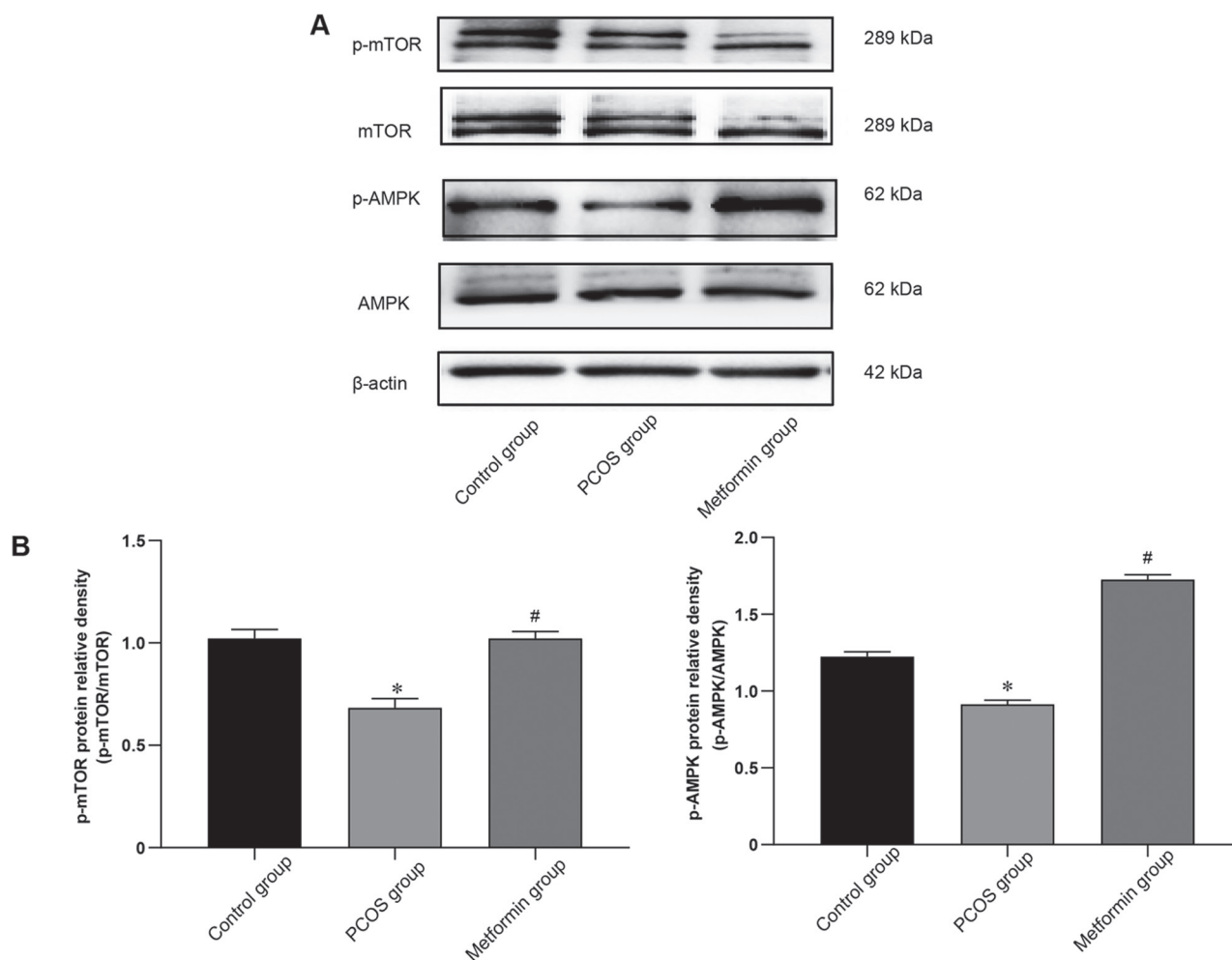


图 7. 二甲双胍可能通过促进AMPK、mTOR磷酸化改善PCOS

Fig. 7. Metformin may improve PCOS by promoting the phosphorylation of AMPK and mTOR. *A*: Western blot of mTOR, p-mTOR, AMPK, and p-AMPK. *B*: Protein relative density of p-AMPK and p-mTOR. Mean \pm SEM, $n = 3$. * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs PCOS group

甲双胍改善 PCOS 糖脂代谢紊乱、性激素紊乱、排卵障碍等作用，并发现二甲双胍能够调控 AMH 稳态，促进 FGSCs 增殖，改善卵泡发育和成熟，这些发现将为 PCOS 的发病机制研究及临床治疗提供新线索，但是其具体的作用机制还需要进一步探索。

参考文献

- Sohrevardi SM, Heydari B, Azarpazhooh MR, Teymourzadeh M, Simental-Mendía LE, Atkin SL, Sahebkar A, Karimi-Zarchi M. Therapeutic effect of curcumin in women with polycystic ovary syndrome receiving metformin: a randomized controlled trial. *Adv Exp Med Biol* 2021; 1308: 109–117.
- Zou K, Yuan Z, Yang Z, Luo H, Sun K, Zhou L, Xiang J, Shi L, Yu Q, Zhang Y, Hou R, Wu J. Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. *Nat Cell Biol* 2009; 11(5): 631–636.
- White YA, Woods DC, Takai Y, Ishihara O, Seki H, Tilly JL. Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women. *Nat Med* 2012; 18(3): 413–421.
- Ding X, Liu G, Xu B, Wu C, Hui N, Ni X, Wang J, Du M, Teng X, Wu J. Human GV oocytes generated by mitotically active germ cells obtained from follicular aspirates. *Sci Rep* 2016; 6: 28218.
- Zou K, Hou L, Sun K, Xie W, Wu J. Improved efficiency of female germline stem cell purification using fragilis-based magnetic bead sorting. *Stem Cells Dev* 2011; 20(12): 2197–2204.
- Miao JX (苗晋鑫), Li XM, Miao MS. Data mining and analysis of an animal model of polycystic ovary syndrome. *Chin J Comparat Med (中国比较医学杂志)* 2020; 30(2): 135–140.

- 146 (in Chinese).
- 7 Pasquali R. Contemporary approaches to the management of polycystic ovary syndrome. *Ther Adv Endocrinol Metab* 2018; 9(4):123–134.
 - 8 Song Y (宋颖), Li R. Interpretation of Chinese diagnosis and treatment guidelines for polycystic ovary syndrome. *J Pract Obstet Gynecol (实用妇产科杂志)* 2018; 34(10): 737–741 (in Chinese).
 - 9 Shrikhande L, Shrikhande B, Shrikhande A. AMH and its clinical implications. *J Obstet Gynaecol India* 2020; 70(5): 337–341.
 - 10 Hoyos LR, Visser JA, McLuskey A, Chazenbalk GD, Grogan TR, Dumesic DA. Loss of anti-Müllerian hormone (AMH) immunoactivity due to a homozygous AMH gene variant rs10417628 in a woman with classical polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod* 2020; 35(10): 2294–2302.
 - 11 Dumont A, Robin G, Dewailly D. Anti-müllerian hormone in the pathophysiology and diagnosis of polycystic ovarian syndrome. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2018; 25(6): 377–384.
 - 12 Garg D, Tal R. The role of AMH in the pathophysiology of polycystic ovarian syndrome. *Reprod Biomed Online* 2016; 33(1): 15–28.
 - 13 Wang Z, Nie K, Su H, Tang Y, Wang H, Xu X, Dong H. Berberine improves ovulation and endometrial receptivity in polycystic ovary syndrome. *Phytomedicine* 2021; 91: 153654.
 - 14 Chen J (陈娇), Zhang Y, Zhong YY. Mechanism of microRNA-141 promoting the proliferation of PCOS ovarian granulosa cells through PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Tianjin Med (天津医药)* 2021; 49(7): 673–678 (in Chinese).
 - 15 Zhang C, Liu XR, Cao YC, Tian JL, Zhen D, Luo XF, Wang XM, Tian JH, Gao JM. Mammalian target of rapamycin/eukaryotic initiation factor 4F pathway regulates follicle growth and development of theca cells in mice. *Reprod Fertil Dev* 2017; 29: 768–777.
 - 16 Liu M, Zhu H, Zhu Y, Hu X. Guizhi Fuling Wan reduces autophagy of granulosa cell in rats with polycystic ovary syndrome via restoring the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *J Ethnopharmacol* 2021; 270: 113821.
 - 17 Zhang XY (张新颖), Mao JD, Yang XY, Li SS, Du LY. Research progress of AMPK/mTOR signaling pathway. *J Microbiol (微生物医学杂志)* 2019; 39(3): 109–116 (in Chinese).
 - 18 Zou K, Wang J, Bi H, Zhang Y, Tian X, Tian N, Ma W, Wu J. Comparison of different *in vitro* differentiation conditions for murine female germline stem cells. *Cell Prolif* 2019; 52: e12530.
 - 19 Michaud M, Balardy L, Moulis G, Gaudin C, Peyrot C, Vellas B, Cesari M, Nourhashemi F. Proinflammatory cytokines, aging, and age-related diseases. *J Am Med Dir Assoc* 2013; 14(12): 877–882.
 - 20 Zhang X, Yang Y, Xia Q, Song H, Wei R, Wang J, Zou K. Cadherin 22 participates in the self-renewal of mouse female germ line stem cells via interaction with JAK2 and β -catenin. *Cell Mol Life Sci* 2018; 75(7): 1241–1253.
 - 21 Li S, Wang M, Chen Y, Wang W, Wu J, Yu C, Zheng Y, Pan Z. Role of the hedgehog signaling pathway in regulating the behavior of germline stem cells. *Stem Cells Int* 2017; 2017: 5714608.
 - 22 Jiang Y, Zhu D, Liu W, Qin Q, Fang Z, Pan Z. Hedgehog pathway inhibition causes primary follicle atresia and decreases female germline stem cell proliferation capacity or stemness. *Stem Cell Res Ther* 2019; 10(1): 198.