

· 基础研究 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2025.08.002

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20250520.1602.004\(2025-05-20\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20250520.1602.004(2025-05-20))

PIK3CG 作为多囊卵巢综合征潜在分子标志物的 筛选及初步研究^{*}

黄利营¹,李丽宁¹,覃 晓^{1,2},凌少华^{1,2},田 纯¹,凌燕兰³,陈 荣¹,覃 莉^{1,3△}

(1. 右江民族医学院研究生学院,广西百色 533000;2. 百色市人民医院生殖医学中心,广西百色 533000;
3. 右江民族医学院附属医院生殖医学中心,广西百色 533099)

[摘要] **目的** 通过生物信息学方法探索与多囊卵巢综合征(PCOS)发病相关的基因并在卵巢颗粒细胞中进行验证,为筛选 PCOS 潜在分子标志物提供参考。**方法** 分别以 GSE34526 和 GSE137684 数据集作为训练集和验证集,通过差异表达分析和加权基因共表达网络分析探索与 PCOS 发病潜在相关的炎症相关基因,随后通过受试者工作特征(ROC)曲线对其预测价值进行验证。选取在右江民族医学院附属医院就诊的 PCOS 患者 30 例(PCOS 组)与非 PCOS 患者 27 例(对照组)为研究对象,应用 RT-qPCR 验证颗粒细胞中核心基因的表达水平,采用 Spearman 相关和多元线性回归分析核心基因表达量与各临床参数的相关性,并以 ROC 曲线分析核心基因表达量对 PCOS 的诊断效能,最后在动物模型上验证核心基因的蛋白表达水平。**结果** 共鉴定出 1 888 个差异表达基因、89 个模块相关基因和 366 个炎症反应相关基因,通过取共表达基因及 ROC 曲线验证最终获得核心基因磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 3-激酶催化亚基 γ (PIK3CG)。RT-qPCR 结果显示 PCOS 组颗粒细胞中的 PIK3CG 表达量高于对照组($P<0.05$)。Spearman 相关分析显示,PIK3CG 表达水平与 BMI、睾酮(T)、空腹胰岛素(FINS)、胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)呈正相关($P<0.05$)。多元线性回归分析显示,PCOS 患者的 FINS、HOMA-IR、BMI 随着 PIK3CG mRNA 相对表达水平的升高而增加($P<0.05$)。ROC 曲线分析显示,颗粒细胞中 PIK3CG mRNA 相对表达水平对诊断 PCOS 的 ROC 曲线下面积为 0.659 3。免疫组化结果可见 PCOS 组小鼠卵巢组织中的 PIK3CG 蛋白表达明显升高。**结论** PIK3CG 可能与 PCOS 发病有一定的相关性。

[关键词] 多囊卵巢综合征;生物信息学;炎症;PIK3CG;核心基因

[中图法分类号] R711.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2025)08-1771-10

Screening and preliminary study of PIK3CG as a potential biomarker in polycystic ovary syndrome^{*}

HUANG Liying¹,LI Lining¹,QIN Xiao^{1,2},LING Shaohua^{1,2},TIAN Chun¹,
LING Yanlan³,CHEN Rong¹,QIN Li^{1,3△}

(1. Graduate School, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise, Guangxi 533000, China; 2. Reproductive Medicine Center, Baise People's Hospital, Baise, Guangxi 533000, China; 3. Reproductive Medicine Center, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise, Guangxi 533099, China)

[Abstract] **Objective** To explore the genes related to the pathogenesis of polycystic ovary syndrome (PCOS) through bioinformatics methods and verify them in ovarian granulosa cells, providing a reference for screening potential molecular markers of PCOS. **Methods** The GSE34526 and GSE137684 datasets were respectively used as the training set and validation set. The inflammation-related genes potentially associated with the onset of PCOS were explored through differential expression analysis and weighted gene co-expression network analysis. Subsequently, their predictive value was verified through the receiver operating characteristic (ROC) curve. Thirty patients with PCOS (the PCOS group) and 27 patients without PCOS (the control group) who were treated in Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities were selected as the research objects. RT-qPCR was applied to verify the expression level of core genes in granular cells. Spearman correlation and multiple linear regression were used to analyze the correlation between the ex-

^{*} 基金项目:广西自然科学基金项目(2019GXNSFBA245020);广西壮族自治区卫生健康委自筹经费科研课题(Z-L20230901);右江民族医学院附属医院高层次人才科研项目(Y20196316)。△ 通信作者,E-mail:qinlimy@126.com。

pression level of core genes and various clinical parameters, and the ROC curve was used to analyze the diagnostic efficacy of the expression level of core genes for PCOS. Finally, the protein expression level of core genes was verified on animal models. **Results** A total of 1 888 differentially expressed genes, 89 module-related genes and 366 inflammatory response-related genes were identified. The core gene phosphatidylinositol-4,5-diphosphate 3-kinase catalytic subunit γ (PIK3CG) was ultimately obtained by taking co-expressed genes and verifying with the ROC curve. RT-qPCR results showed that the expression level of PIK3CG in granulosa cells of the PCOS group was higher than that of the control group ($P < 0.05$). Spearman correlation analysis showed that the expression level of PIK3CG was positively correlated with BMI, testosterone (T), fasting insulin (FINS), and insulin resistance index (HOMA-IR, $P < 0.05$). Multivariate linear regression analysis showed that FINS, HOMA-IR and BMI were increased with the increasing of PIK3CG expression level ($P < 0.05$). ROC curve analysis showed that the area under the curve for diagnosing PCOS patients with PIK3CG mRNA expression levels in granulosa cells was 0.659 3. The immunohistochemical results showed that the expression of PIK3CG protein in the ovarian tissues of mice in the PCOS group was significantly increased. **Conclusion** PIK3CG may be potentially associated with the pathogenesis of PCOS.

[Key words] polycystic ovary syndrome; bioinformatics; inflammation; PIK3CG; core gene

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 是一种复杂的内分泌疾病,影响着全球 5%~20% 的育龄期女性^[1]。PCOS 的典型特征是存在不同程度的高雄激素血症、胰岛素抵抗和排卵功能障碍,临床表现为高雄激素特征(多毛、痤疮和脱发)、月经稀发或无月经及卵巢多囊形态^[2]。PCOS 传统上被归类为生殖系统疾病,但现在被认为是一种与肥胖相关的代谢紊乱疾病,会增加 2 型糖尿病和心血管疾病的发生风险^[3],严重影响女性患者在青春期末至更年期的身心健康。

炎症参与了肥胖、2 型糖尿病和心血管疾病等多种疾病的发生,而有大量研究表明这些疾病与 PCOS 密切相关^[4-5]。多项研究报道,PCOS 与体内炎症或促炎因子水平升高有关^[6-8]。LIU 等^[9]研究表明了苍附导痰汤可通过下调炎症环境中胰岛素通路中核因子- κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B)/脂质运载蛋白 2 (lipocalin-2, LCN-2) 和上调胰岛素受体 (insulin receptor, Insr)/胰岛素受体底物-1 (insulin receptor substrate-1, Irs-1)/葡萄糖转运蛋白 4 (glucose transporter 4, Glut4) 基因表达,在改善 PCOS 合并胰岛素抵抗大鼠卵巢功能方面发挥积极作用。LIU 等^[10]发现 PCOS 患者卵泡液中 IL-1 β 和 IL-18 水平明显升高, NF- κ B 通路在 PCOS 患者的糖皮质激素中被激活,并且 NLRP3 炎症小体形成,进而引发一系列炎症级联反应。这些炎症反应可能破坏卵巢组织的微环境,影响卵巢颗粒细胞的功能,干扰卵泡的正常发育和卵巢激素的分泌,同时也可能影响机体的代谢平衡,改变糖脂代谢等,从而对 PCOS 的发生发展产生重要影响。目前对 PCOS 炎症反应相关基因的研究比较有限。因此,对炎症相关基因的系统全面研究可能有助于了解 PCOS 与炎症之间的联系。

本研究通过生物信息学方法筛选出与 PCOS 发病潜在相关的炎症相关基因,利用预测模型评估其可

靠性,并通过 GeneMANIA 预测功能。进一步应用 RT-qPCR 验证磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 3-激酶催化亚基 γ (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit γ , PIK3CG) 在 PCOS 患者与非 PCOS 患者卵巢颗粒细胞标本中的表达差异情况,探究其表达水平与各临床参数的相关性及对 PCOS 的预测价值,同时在动物模型上验证核心基因的蛋白表达水平,为探索 PCOS 的发病机制提供新的思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2022 年 9 月至 2023 年 9 月在右江民族医学院附属医院生殖医学中心就诊的 PCOS 患者作为 PCOS 组,诊断标准参照欧洲生殖和胚胎医学会与美国生殖协会 2003 年制定的鹿特丹标准^[11]。选取同期行辅助生殖技术助孕的非 PCOS 患者作为对照组,月经周期规律[月经周期 (28 $\pm$ 7) d]、排卵正常,基础内分泌测定无明显异常,无子宫或卵巢疾病。所有患者近 3 个月无激素类药物服用史,无降糖药、干扰脂类代谢、胰岛素增敏剂、降脂类等药物治疗。本研究通过右江民族医学院附属医院医学伦理委员会批准(审批号:YYFY-LL-2022-61)。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂

淋巴细胞分离液(北京索莱宝科技有限公司);逆转录酶 (ToloScript All-in-one RT EasyMix for qPCR, 上海吐露港生物科技有限公司),预混液[2 $\times$ Q3 SYBR qPCR Master mix (Universal), 上海吐露港生物科技有限公司];RT-qPCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成;PTG PIK3CG 多克隆抗体(武汉三鹰生物技术有限公司)。

1.2.2 数据来源及差异表达分析

GEO 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)是一个广泛使用的国际公共数据库,专门用于

存储高通量基因表达和表观基因组学数据^[12]。本研究从 GEO 数据库下载 GSE34526 和 GSE137684 数据集。其中,数据集 GSE34526 作为训练集,包含接受体外受精的 PCOS 女性($n=7$)和健康女性($n=3$)的颗粒细胞转录组数据。数据集 GSE137684 作为验证集,标本来自中国地区,其中包含了 8 例 PCOS 患者和 4 例对照组患者的颗粒细胞转录组数据。通过使用 QuickGO 在线数据库(<https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>),以“inflammatory response-related genes”为关键词进行检索,并将物种限定为 Homo sapiens,最终获得了 366 个与炎症反应相关基因(inflammatory response related genes,IRRGs)。

随后,通过 R4.3.1 软件对 GSE34526 数据集进行校正、归一化处理并转换基因 ID,使用“Limma”包识别数据集内的差异表达基因(differentially expressed genes,DEGs)。最后,根据 $P < 0.05$ 、 $|\log_2FC| > 0.5$ 的阈值筛选数据集内的 DEGs,并使用 ggplot2 包和 pheatmap 包分别将其可视化为火山图和热图。

1.2.3 加权基因共表达网络分析(weighted gene co-expression network analysis,WGCNA)

WGCNA 可识别具有重要生物学相关性的共表达基因模块,并评估与疾病相关的基因网络之间的关联。使用 R4.3.1 软件中的 WGCNA 工具,对 GSE34526 数据集进行 WGCNA。通过 WGCNA 包中的 pick soft threshold 工具选择合适的幂值,以遵循 1~20 内的无尺度网络系统。

1.2.4 核心基因的识别和验证

使用 R4.3.1 软件中的 VennDiagram 包对 GSE34526 数据集内的 DEGs,从 GO 数据库获取的 IRRGs 及 WGCNA 中 salmon 模块的基因进行交集分析,从而得到核心基因。以 GSE34526 数据集为训练集,以 GSE137684 数据集为验证集,使用 R4.3.1 “pROC”验证核心基因的受试者工作特征(receiver operating characteristic,ROC)曲线。

1.2.5 核心基因的蛋白质-蛋白质互作网络(Protein-protein interaction network of hub genes,PPI)

GeneMANIA(<http://genemania.org>)是一个灵活的网站,可用于生成基因功能假设、分析基因列表并为功能分析确定基因的优先级。给定一个查询基因列表,GeneMANIA 会利用大量基因组学和蛋白质组学数据找到功能相似的基因^[13]。本研究采用 GeneMANIA 对核心基因进行 PPI 分析。

1.2.6 卵泡液颗粒细胞的收集

于取卵日经阴道超声引导下抽吸受试者的卵泡液,将采集的卵泡液迅速置于显微镜下观察,观察到卵母细胞呈现为圆形或椭圆形,表面光滑,质地均匀,周围被一层透明带包裹。而卵冠丘颗粒细胞呈现放射状或团状分布,紧密包裹在卵母细胞周围,外观呈

云雾状或毛刺状。经实验室人员完成捡卵后,收集剩余的卵泡液(尽量留取含血较少的卵泡液)于 50 mL 离心管中,放置于冰盒内并尽快进行卵泡液颗粒细胞的分离。通过低速离心($300\sim400\text{ r/min}$,5 min)沉淀颗粒细胞,去除上清液中的血液、碎片或其他杂质,重复两次以确保标本纯净,留沉淀物及少量卵泡液于管底,将离心后的沉淀物(含颗粒细胞)与适量 PBS 充分混匀以配置细胞悬液。最后使用淋巴细胞分离液利用密度梯度分离法收集中间层颗粒细胞,PBS 洗涤 3 次备用^[14]。

1.2.7 RT-qPCR 检测核心基因 mRNA 水平

采用 TRIzol 法提取颗粒细胞的总 RNA。使用逆转录试剂盒进行逆转录,按照试剂盒说明取等量的细胞总 RNA 1 000 ng,其反应体系如下:5×All-in-one RT Buffer 预混液 4 μL ,All-in-one Enzyme Mix 预混液 1 μL ,模板 RNA 1 μL ,去 RNA 酶双蒸水 14 μL 。反应程序如下:50 $^{\circ}\text{C}$ 15 min,随后 85 $^{\circ}\text{C}$ 5 s 反应终止。采用 2×Q3 SYBR qPCR Master mix (Universal)进行 RT-qPCR,反应体系如下:2×Q3 SYBR qPCR Master mix (Universal) 10 μL ,正向引物 0.4 μL ,反向引物 0.4 μL ,Template DNA/cDNA 1.0 μL ,ddH₂O 8.2 μL 。反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min 预变性后 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 进行 40 个循环。引物序列为 PIK3CG 上游:5'-GGA ATA GGC GAC AGA CAC AAT GAC-3';下游:5'-GGG TTA GCA CAA ATG GCA CTC TC-3'。GAPDH 上游:5'-CGG GAA ACT GTG GCG TGA T-3';下游:5'-TGC TCA GTG TAG CCC AGG ATG -3',GAPDH 作为内参基因,数据分析采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算相对表达量。

1.2.8 动物实验

1.2.8.1 动物模型的建立和分组

12 只 3 周龄健康雌性 C57BL/6 小鼠分为对照组和 PCOS 组,每组 6 只。对照组注射 0.1 mL 芝麻油,PCOS 组注射 0.1 mL 芝麻油+脱氢表雄酮(6 mg/100 g),连续 21 d 皮下注射。从注射第 13 天开始,每天采集阴道涂片观察发情周期持续 10 d。观察后处死小鼠并取卵巢组织进行固定、石蜡包埋、切片处理,用于卵巢组织 HE 染色和免疫组化。动物实验通过右江民族医学院伦理委员会批准(审批号:2024030802)。

1.2.8.2 卵巢组织免疫组化

将卵巢组织切片进行脱蜡和水化处理后,在水浴锅中加热进行抗原修复。用 3% H₂O₂ 去离子水孵育,以阻断内源性过氧化物酶的活性。随后,加入一抗 PIK3CG(1:1 000),并在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。孵育后,用 PBS 进行洗涤,随后添加反应增强液,并在室温下孵育 20 min。再次使用 PBS 洗涤后,加入相应的二抗进行孵育,接着用二氨基联苯胺进行显色反应。最后,用自来水彻底冲洗,进行苏木素复染,依次进行

梯度乙醇脱水、透明处理并封片,最终在显微镜下观察并拍照。

1.3 统计学处理

采用 GraphPadPrism9.4.1 和 SPSS27.0 软件对实验、临床数据进行处理和统计学分析,对符合正态分布计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组独立样本比较采用 t 检验;对不符合正态分布以 $M(Q_1, Q_3)$ 表示,组间比较采用非参数的秩和检验。采用 Spearman 相关、多元线性回归分析描述临床指标之间相关性。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DEGs 的筛选

数据集 GSE23426 共鉴定出 1 888 个 DEGs,其中包括 1 271 个上调 DEGs 和 617 个下调 DEGs。明显上调的前 15 个 DEGs 是 PIK3CG、CD163、MRC1、EPB41L3、HMOX1、PECAM1、TGFB1、KCNE3、HTATSFP2、PTPRJ、MAFB、FCGR1BP、OLR1、

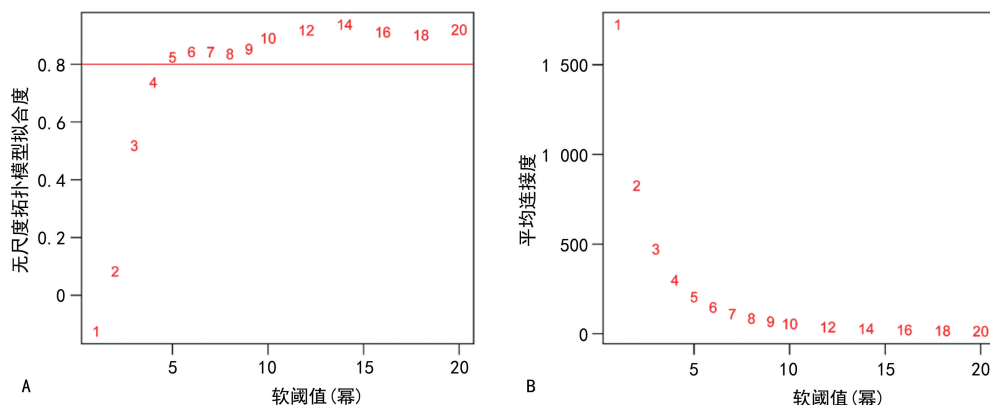
TREM2 和 SORL1。

2.2 WGCNA

按照方差从大到小进行排序,选择方差最大的 25% 基因进行分析。去除异常值后得到了样本聚类树。软阈值设为 9 ($R^2 = 0.8$),以构建无标度网络,见图 1。

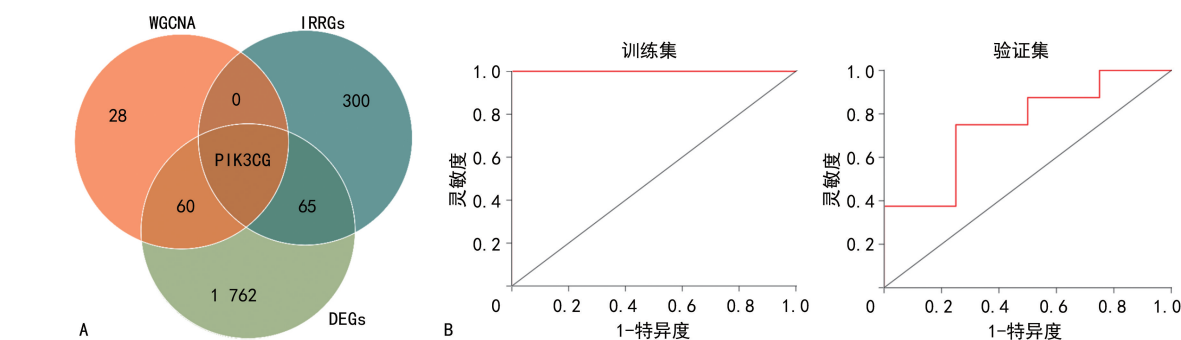
2.3 核心基因的鉴定和验证

使用 R 软件中的 VennDiagram 包对 GO 数据库中 1 888 个 DEGs、WGCNA 中鲑红模块中的 89 个基因和 366 个 IRRGs 进行交集分析,最终得到了核心基因,即 PIK3CG,见图 2A。为了验证 PIK3CG 对 PCOS 的预测价值,使用 GSE34526 数据集作为训练集, GSE137684 作为验证集进行 ROC 曲线分析。ROC 曲线分析表明,在训练集和验证集中,PIK3CG 对 PCOS 均很好的预测效果[曲线下面积(area under the curve, AUC)分别为 1.00 和 0.75],见图 2B。



A:尺度无关性;B:平均连接度。

图1 WGCNA 分析图



A:韦恩图;B:训练集和验证集中 PIK3CG 的 ROC 曲线。

图2 核心基因的鉴定和验证

2.4 PIK3CG 与其交互基因之间的交互网络

利用 GeneMANIA 数据库分析了 PIK3CG 与其交互基因的互作网络。PIK3CG 基因位于相互作用网络的中心,见图 3。这 20 个基因通过物理相互作用、共表达、预测共定位、遗传相互作用、通路及共享的蛋白结构域,与 PIK3CG 基因表现出密切的关系。与 PIK3CG 关联度最高的基因包括 PIK3R5、PIK3R6、PIK3CD、BCR、ERAS、EPA8、GNG2、FC-

ER1G、PRKCB、GNB1、KIT、PIK3CB、PIK3CA、SYK、RAB8A、GP6、CXCR4、FPR1、PDE3B、GAB1。PIK3CG 与 WBC 趋化、中性粒细胞迁移、脂质修饰、对胰岛素的反应、甘油磷脂生物合成过程、磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositide 3-kinases, PI3K)信号转导和粒细胞迁移等功能有关。

2.5 研究对象临床资料

共收集卵泡液标本 57 例,其中 PCOS 组 30 例,

对照组 27 例,研究对象的临床特征见表 1。排除了年龄、BMI 的混杂因素干扰后,两组研究对象不孕时间、促卵泡生成素(follicle stimulating hormone,FSH)、空腹血糖、优胚数、优胚率进行比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。PCOS 组血清中促黄体生成素(luteinizing hormone,LH)和睾酮(testosterone,T)、抗缪

勒管激素(anti-Müllerian hormone,AMH)、空腹胰岛素(fasting insulin,FINS)、胰岛素抵抗指数(homeostasis model assessment,HOMA-IR)、LH/FSH、窦卵泡数、获卵数、成熟卵数、正常受精卵数、可利用胚胎数均高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

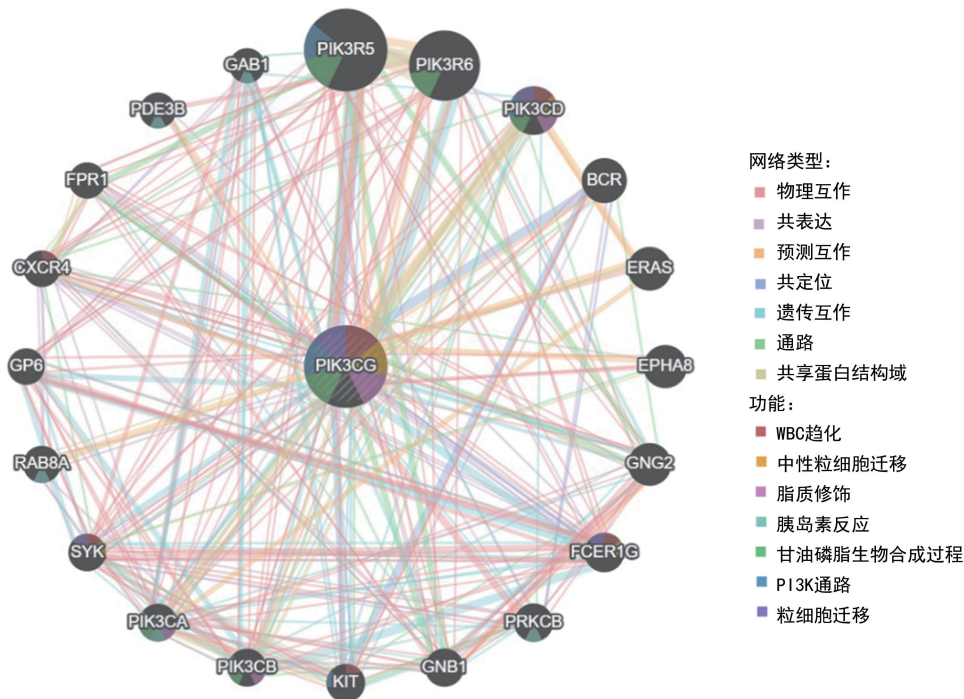


图 3 PIK3CG 的 PPI 网络图

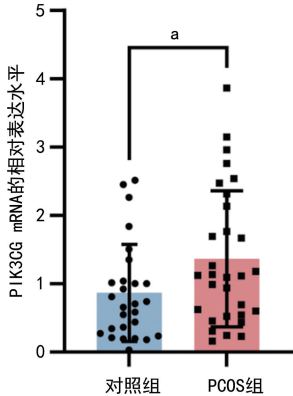
表 1 PCOS 组与对照组的临床特征比较

项目	对照组($n=27$)	PCOS 组($n=30$)	t/Z	P	P^a
年龄($\bar{x}\pm s$,岁)	32.18 $\pm$ 3.20	31.43 $\pm$ 4.39	-0.744	0.460	
BMI[$M(Q_1,Q_3)$,kg/m ²]	22.03(19.56,24.65)	25.31(20.61,28.67)	-2.326	0.020	
不孕时间[$M(Q_1,Q_3)$,年]	3(1,6)	3(2,4)	-0.324	0.746	0.481
窦卵泡数[$M(Q_1,Q_3)$,个]	12(9,15)	27(25,30)	-6.388	<0.001	<0.001
LH[$M(Q_1,Q_3)$,IU/L]	4.27(3.12,5.70)	4.78(3.26,8.60)	0.228	0.228	0.038
FSH($\bar{x}\pm s$,IU/L)	7.12 $\pm$ 2.96	5.82 $\pm$ 2.33	-1.853	0.069	0.074
LH/FSH($\bar{x}\pm s$)	0.68 $\pm$ 0.24	1.10 $\pm$ 0.64	3.315	0.002	<0.001
T[$M(Q_1,Q_3)$, μ g/L]	0.39(0.28,0.47)	0.90(0.48,1.00)	-5.061	<0.001	<0.001
AMH[$M(Q_1,Q_3)$,ng/mL]	2.62(1.51,4.10)	6.01(4.27,8.94)	-5.139	<0.001	<0.001
FINS[$M(Q_1,Q_3)$,pmol/L]	50.00(39.00,68.00)	61.10(55.76,97.30)	-3.070	0.002	0.029
HOMA-IR[$M(Q_1,Q_3)$]	1.55(1.21,2.09)	1.86(1.71,3.34)	-3.181	0.001	0.016
空腹血糖($\bar{x}\pm s$,mmol/L)	4.78 $\pm$ 0.43	4.96 $\pm$ 0.53	1.463	0.149	0.322
获卵数($\bar{x}\pm s$,个)	14.15 $\pm$ 6.58	20.47 $\pm$ 8.71	3.036	0.003	0.001
成熟卵数($\bar{x}\pm s$,个)	11.56 $\pm$ 6.11	17.80 $\pm$ 7.95	3.296	0.002	<0.001
正常受精卵数($\bar{x}\pm s$,个)	8.93 $\pm$ 5.23	12.90 $\pm$ 6.51	2.523	0.015	0.016
优胚数[$M(Q_1,Q_3)$,个]	5(2,6)	5(4,8)	-1.235	0.217	0.114
可利用胚胎数($\bar{x}\pm s$,个)	8.41 $\pm$ 5.06	13.03 $\pm$ 6.24	3.504	0.003	0.003
优胚率($\bar{x}\pm s$,%)	60.18 $\pm$ 18.78	50.43 $\pm$ 26.13	-1.602	0.115	0.246

优胚率=(优胚数/可利用胚胎数) $\times$ 100%;^a:排除了年龄、BMI 的混杂因素干扰后。

2.6 PIK3CG 在两组患者颗粒细胞中的表达

PCOS 患者卵泡液颗粒细胞中 PIK3CG mRNA 的相对表达水平高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 4。



^a: $P<0.05$ 。
图 4 PCOS 组与对照组 PIK3CG mRNA 的相对表达水平

2.7 两组颗粒细胞 PIK3CG mRNA 表达水平与临床参数的相关性

Spearman 相关分析结果显示,PCOS 组颗粒细胞中 PIK3CG mRNA 的表达水平与 BMI、T、FINS、HOMA-IR 呈正相关,与优胚率呈负相关($P<0.05$),见表 2;对照组颗粒细胞中 PIK3CG mRNA 的表达水平与各临床参数无相关性($P>0.05$),见表 3。

表 2 PCOS 组卵泡液颗粒细胞 PIK3CG mRNA 表达水平与临床参数的相关性

项目	<i>r</i>	<i>P</i>
年龄	0.003	0.989
BMI	0.425	0.019
不孕年限	-0.012	0.950
窦卵泡数	0.208	0.270
FSH	-0.050	0.795
LH	0.070	0.715
LH/FSH	0.019	0.919
T	0.435	0.016
AMH	0.103	0.586
FINS	0.542	0.002
HOMA-IR	0.618	<0.001
空腹血糖	0.013	0.946
获卵数	0.223	0.236
成熟卵数	0.167	0.379
正常受精卵数	0.245	0.192
优胚数	-0.077	0.688
可利用胚胎数	0.232	0.218
优胚率	-0.405	0.026

2.8 多元线性回归分析

以 PIK3CG mRNA 表达水平为自变量,分别以

PCOS 患者的 BMI、T、FINS、HOMA-IR、优胚率为因变量,进行多元线性回归分析,结果显示,排除了年龄、BMI 等混杂因素干扰后,PCOS 患者的 FINS($\beta=0.710, P<0.001$)、HOMA-IR($\beta=0.591, P=0.005$)随着 PIK3CG mRNA 表达水平的升高而增加,而对 T 和优胚率无影响($P>0.05$);排除了年龄、T、FINS、HOMA-IR 的混杂因素干扰后,PCOS 患者的 BMI($\beta=0.727, P<0.001$)随着 PIK3CG mRNA 相对表达水平的升高而增加。

表 3 对照组卵泡液颗粒细胞 PIK3CG mRNA 表达水平与临床参数的相关性

项目	<i>r</i>	<i>P</i>
年龄	0.047	0.814
BMI	0.068	0.736
不孕年限	-0.210	0.292
窦卵泡数	0.083	0.680
FSH	-0.251	0.270
LH	0.097	0.630
LH/FSH	0.307	0.119
T	0.199	0.319
AMH	0.188	0.348
FINS	0.116	0.566
HOMA-IR	0.158	0.431
空腹血糖	0.160	0.424
获卵数	0.082	0.683
成熟卵数	0.022	0.913
正常受精卵数	0.016	0.936
优胚数	0.057	0.777
可利用胚胎数	-0.004	0.984
优胚率	0.097	0.630

2.9 ROC 曲线分析颗粒细胞 PIK3CG mRNA 相对表达水平预测 PCOS 的效能

使用 R 语言绘制颗粒细胞中 PIK3CG mRNA 相对表达水平预测 PCOS 的效能的 ROC 曲线,结果显示,颗粒细胞中 PIK3CG mRNA 相对表达水平对诊断 PCOS 的 AUC 为 0.659 3,见图 5。

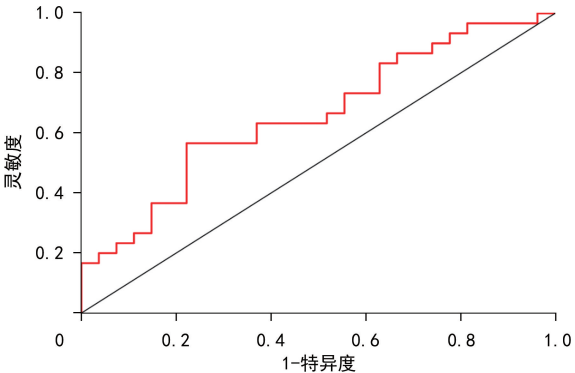
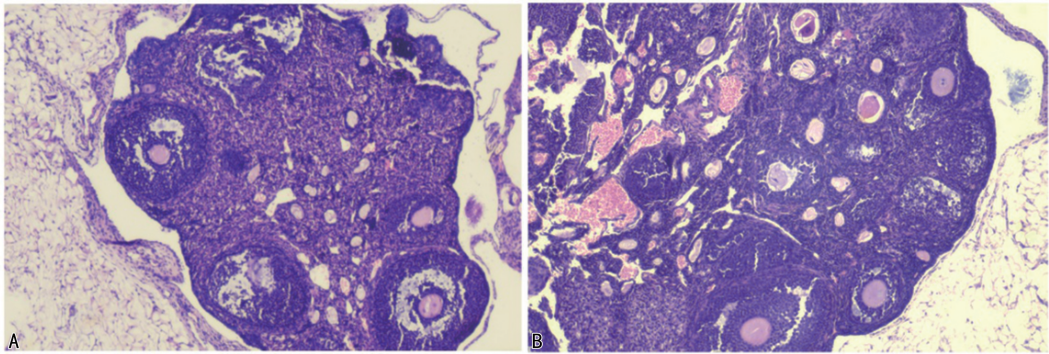


图 5 颗粒细胞 PIK3CG mRNA 相对表达水平诊断 PCOS 的 ROC 曲线

2.10 PCOS 组小鼠卵巢组织 PIK3CG 蛋白表达情况

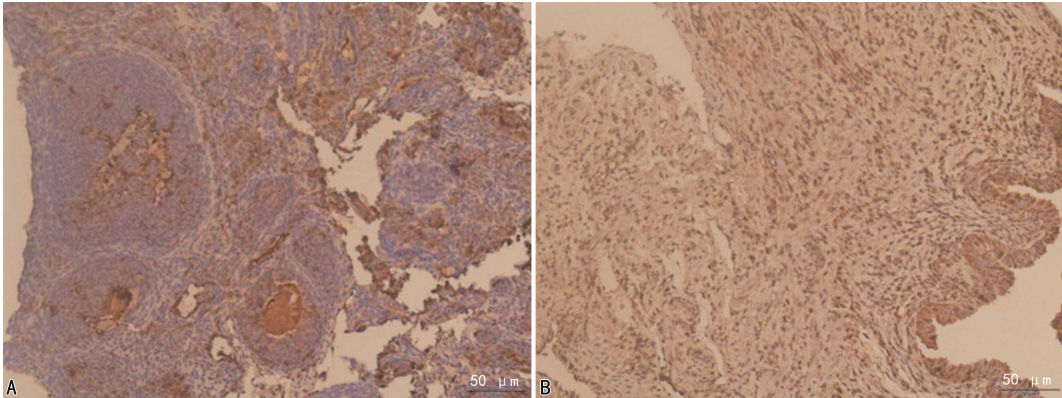
卵巢 HE 染色结果显示,PCOS 组小鼠的卵巢组织中病理性囊状卵泡数目增多,颗粒层变薄表明 PCOS 小鼠模型构建成功,见图 6。免疫组化分析结果

显示,与对照组相比,PCOS 组小鼠卵巢组织中的 PIK3CG 蛋白表达升高,见图 7。



A:对照组小鼠卵巢组织形态;B:PCOS 模型组小鼠卵巢组织形态。

图 6 小鼠卵巢组织中囊状卵泡(HE 染色,40×)



A:对照组;B:PCOS 组。

图 7 两组免疫组化结果

3 讨 论

PCOS 是一种全身性、多因素、炎症性、自身免疫性疾病^[4]。PCOS 会损害女性的生育能力,增加糖尿病、心血管疾病、精神疾病和其他健康问题的风险^[15],寻找可靠的诊断标志物及治疗靶点具有重要意义。有研究表明,促炎细胞因子和趋化因子及人体血液中 WBC 水平升高与 PCOS 有关,炎症可能会导致多囊卵巢综合征的发生^[16-18]。炎症是导致许多疾病发生发展的重要因素^[19]。本研究利用生物信息学方法筛选并确定了 PCOS 相关的潜在关键炎症基因 PIK3CG,并通过 GeneMANIA 预测了 PIK3CG 的功能,发现其参与 WBC 趋化、中性粒细胞迁移、脂质修饰、对胰岛素的反应、甘油磷脂生物合成过程和粒细胞迁移等过程。

对研究对象的临床资料进行比较,并排除年龄、BMI 等混杂因素的影响后,发现 PCOS 组的 LH、T、AMH、LH/FSH、FINS、HOMA-IR、窦卵泡数均高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),符合 PCOS 高雄激素分泌过多、卵巢多囊样变的主要特征,伴有促性腺激素分泌异常、糖代谢紊乱,提示选取的研究对象者具有代表性,后续试验分析结果可靠。本研究利

用 RT-qPCR 技术检测临床标本卵泡液颗粒细胞中 PIK3CG mRNA 的相对表达水平,发现 PCOS 组 PIK3CG mRNA 的相对表达水平高于对照组($P<0.05$)。同时,免疫组化结果提示 PCOS 组小鼠卵巢组织中 PIK3CG 蛋白表达水平高于对照组。ZOU 等^[20]通过注射脱氢表雄酮建立 PCOS 小鼠模型,亦发现在 PCOS 模型小鼠中的 PIK3CG mRNA 和蛋白表达水平均明显高于对照组。由此可见,无论是动物模型还是临床水平,PIK3CG 在 PCOS 组中均呈现高表达,提示 PIK3CG 可能与 PCOS 的发生密切相关。

进一步分析 PCOS 组颗粒细胞中 PIK3CG mRNA 表达水平与临床参数的相关性,结果显示 PIK3CG 表达水平与 BMI、T、FINS 和 HOMA-IR 呈正相关,表明 PIK3CG 的上调可能参与了 PCOS 的核心病理环节,如高雄激素血症、糖代谢异常和肥胖等。多元线性回归分析显示,排除了混杂因素干扰后,FINS、HOMA-IR、BMI 随着 PIK3CG mRNA 表达水平的升高而增加,提示 PIK3CG 与 PCOS 患者糖脂代谢紊乱密切相关。KOBAYASHI 等^[21]研究发现,敲除 PIK3CG 基因的肥胖小鼠表现出全身胰岛素敏感性明显改善,并伴有胰岛素信号传导的增强,PIK3CG

mRNA 的表达水平与 BMI 呈正相关,与本研究结果一致。BECATTINI 等^[22]研究同样表明,在接受高脂饮食的情况下,敲除 PIK3CG 的小鼠体重增加率明显降低,胰岛素敏感性提高,脂肪组织炎症也有所减少,提示 PIK3CG 在肥胖和胰岛素抵抗的发生中起到了重要作用。此外,对 PCOS 组临床病理指标进行分析发现,虽然 PCOS 患者的获卵数、成熟卵数、正常受精卵数、可利用胚胎数较对照组增多,但两组的优胚数、优胚率差异无统计学意义,PCOS 组的优胚率较低。相关性分析提示 PCOS 组 PIK3CG mRNA 表达水平与优胚率呈负相关,推测高水平的 PIK3CG 可能通过引发炎症反应影响卵子质量和胚胎发育潜能,导致 PCOS 患者的优胚率减少。若在辅助生殖助孕过程中添加 PIK3CG 干预剂,从抑制炎症水平的角度是否可提高优胚率,改善妊娠结局,值得进一步深入研究。

多项研究表明,PI3K/蛋白激酶 B(protein Kinase B, Akt) 通路与 PCOS 发病相关^[23-26],但其具体的调控机制仍未阐明。PIK3CG 编码的 p110 γ 亚基是 PI3K 的催化亚基^[27],PI3K 可通过促进磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸(phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PIP2)向磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸(phosphatidylinositol 4,5-triphosphate, PIP3)转化,激活 PI3K/Akt 通路^[28];PIP3 通过招募并磷酸化 Akt^[29],进而激活 Akt, Akt 将作为 PI3K/Akt 通路的核心部分在下游发挥多种生物学效应^[30]。由此可见,PIK3CG 在 PI3K/Akt 通路的激活过程中起到了核心作用。PIK3CG 可能通过 PI3K/Akt 通路介导 PCOS 的发病。ZHANG 等^[31]表明通过降低 PIK3CG 的表达水平可抑制 PI3K/Akt/mTOR/p70S6K/ULK1 通路。胰岛素和胰岛素样生长因子(insulin like growth factor, IGF-1)是激活 PI3K/Akt 通路的关键分子, IGF-1 及其受体的表达上调能够激活 PI3K/Akt 通路^[32]。叉头框蛋白基因作为 PI3K/Akt 通路的直接下游靶点,与细胞凋亡、胰岛素抵抗及卵母细胞质量密切相关^[33-35]。而 PIK3CG 对 PI3K/Akt 通路的独特的催化和调控作用可能间接影响到叉头框蛋白基因、IGF-1 的功能,从而在胰岛素抵抗及卵母细胞质量等与 PCOS 发病相关的关键环节产生连锁反应。

BECATTINI 等^[36]研究表明,敲除 PIK3CG 的表达能够改善胰岛素水平、减少脂肪变性、缓解代谢性炎症,并通过调控急性中性粒细胞的浸润和肝细胞的代偿性增生,抑制肥胖导致的肝细胞癌的发展。另一项研究通过在肥胖引起的胰腺 β 细胞衰竭和糖尿病的小鼠遗传模型中敲除 PIK3CG 后,发现小鼠胰岛素敏感性有所改善,同时胰腺 β 细胞凋亡有所减少, PIK3CG 可能成为治疗肥胖和胰岛素抵抗的有效靶点^[37]。在急性肾损伤的小鼠模型中,抑制 PIK3CG 的表达同样表现出减少炎症细胞浸润的效果^[38]。PIK3CG 还被认为是治疗自身免疫性疾病、癌症和心

血管疾病的潜在药物靶点^[39-40]。而 PCOS 是一种多因素、炎症性、自身免疫性疾病^[4], PIK3CG 可作为治疗 PCOS 的一个有前景的靶点,值得更多的研究探讨。

本研究表明,PCOS 患者中 PIK3CG 的表达水平升高,并与部分临床参数相关,提示 PIK3CG 参与了 PCOS 的发病。ROC 曲线分析颗粒细胞中 PIK3CG mRNA 的表达水平对 PCOS 的诊断效能,结果显示 PIK3CG 的表达水平诊断 PCOS 患者的 AUC 为 0.659 3。这提示了 PIK3CG 对 PCOS 有一定的预测价值,有望成为辅助诊断 PCOS 生物学标志物之一。目前,PIK3CG 与 PCOS 相关性的研究极少,在 PCOS 的测序数据中,现有可用的测序数据少,且存在样本量较小等情况,这可能导致分析结果存在一定的偏倚。下一步本课题组将进一步扩大样本量,在多中心的群体中进行验证,以增强结论的普适性和可靠性。同时后续开展 PIK3CG 的直接功能研究,通过敲除/过表达卵巢颗粒细胞中的 PIK3CG 基因,观察其对 PI3K/Akt 通路及 PCOS 相关生理病理指标的影响,强化对 PIK3CG 作用机制的阐释,从而更精准地明确 PIK3CG 在 PI3K/Akt 通路与 PCOS 关联中所扮演的独特且关键的角色,为解析 PCOS 发病机制和寻找潜在治疗靶点提供关键依据。

综上所述,本研究通过生物信息学方法筛选出 PIK3CG 为影响 PCOS 发病的核心基因,并用 ROC 曲线预测价值,此外,通过 RT-qPCR 技术、免疫组化技术和相关性分析证明了 PIK3CG 的高表达与 PCOS 发病相关。GeneMANIA 分析显示 PIK3CG 与 WBC 趋化、中性粒细胞迁移、脂质修饰、对胰岛素的反应、甘油磷脂生物合成过程和粒细胞迁移等过程密切相关,这可能有助于阐明 PCOS 的发病机制,并为其治疗提供一个潜在的研究靶点。

参考文献

- [1] LIU X, ZHANG J, WANG S. Global, regional, and national burden of infertility attributable to PCOS, 1990–2019[J]. Hum Reprod, 2024, 39(1):108–118.
- [2] TEEDE H J, TAY C T, LAVEN J, et al. Recommendations from the 2023 international evidence-based guideline for the assessment and management of polycystic ovary syndrome[J]. Fertil Steril, 2023, 120(4):767–793.
- [3] DONG J, REES D A. Polycystic ovary syndrome: pathophysiology and therapeutic opportunities[J]. BMJ Med, 2023, 2(1):e000548.
- [4] ARMANINI D, BOSCARO M, BORDIN L, et al. Controversies in the pathogenesis, diagnosis

- and treatment of PCOS: focus on insulin resistance, inflammation, and hyperandrogenism[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(8): 4110.
- [5] LIAO W T, HUANG J Y, LEE M T, et al. Higher risk of type 2 diabetes in young women with polycystic ovary syndrome: a 10-year retrospective cohort study[J]. *World J Diabetes*, 2022, 13(3): 240-250.
- [6] RUDNICKA E, SUCHTA K, GRYMOWICZ M, et al. Chronic low grade inflammation in pathogenesis of PCOS[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(7): 3789.
- [7] ROSTAMTABAR M, ESMAEILZADEH S, TOURANI M, et al. Pathophysiological roles of chronic low-grade inflammation mediators in polycystic ovary syndrome[J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(2): 824-838.
- [8] 杨茵, 林思怡, 谭嘉哲, 等. 基于 TLR4/NF- κ B 信号通路探讨小檗碱联合槲皮素对多囊卵巢综合征大鼠的影响[J]. *重庆医学*, 2024, 53(23): 3540-3545.
- [9] LIU S, ZHANG Y, YANG F, et al. Modified cangfu daotan decoction ameliorates polycystic ovary syndrome with insulin resistance via NF- κ B/LCN-2 signaling pathway in inflammatory microenvironment[J]. *Front Endocrinol*, 2022, 13: 975724.
- [10] LIU Y, LIU H, LI Z, et al. The release of peripheral immune inflammatory cytokines promote an inflammatory cascade in PCOS patients via altering the follicular microenvironment[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 685724.
- [11] ESCOBAR-MORREALE H F. Polycystic ovary syndrome: definition, aetiology, diagnosis and treatment[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2018, 14(5): 270-284.
- [12] CLOUGH E, BARRETT T, WILHITE S E, et al. NCBI GEO: archive for gene expression and epigenomics data sets: 23-year update[J]. *Nucleic Acids Res*, 2024, 52(1): D138-144.
- [13] FRANZ M, RODRIGUEZ H, LOPES C, et al. GeneMANIA update 2018 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(1): W60-64.
- [14] 符山花, 包利利, 赵达, 等. 抑制 NLRP3 炎症小体激活可调节自噬改善多囊卵巢综合征颗粒细胞凋亡[J]. *中国免疫学杂志*, 2024, 40(8): 1646-1652.
- [15] CHE Y, YU J, LI Y S, et al. Polycystic ovary syndrome: challenges and possible solutions [J]. *J Clin Med*, 2023, 12(4): 1500.
- [16] ABRAHAM G S, DIVAKAR P Y, VALSALA G A. Association of metabolic and inflammatory markers with polycystic ovarian syndrome (PCOS): an update[J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2021, 303(3): 631-643.
- [17] LI X, LIN S, YANG X, et al. When IGF-1 meets metabolic inflammation and polycystic ovary syndrome [J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 138: 112529.
- [18] XIANG Y, LIU S, WAN S, et al. Interleukin-1 increases SERPINE1 expression in human granulosa-lutein cell via p50/p52 signaling pathways[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2024, 591: 112274.
- [19] LU Y, CHEN J, TANG K, et al. Development and validation of the prognostic index based on inflammation-related gene analysis in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Front Mol Biosci*, 2021, 8: 667459.
- [20] ZOU L, LI W, XU D, et al. Alteration of the N(6)-methyladenosine methylation landscape in a mouse model of polycystic ovary syndrome [J]. *J Ovarian Res*, 2023, 16(1): 157.
- [21] KOBAYASHI N, UEKI K, OKAZAKI Y, et al. Blockade of class IB phosphoinositide-3 kinase ameliorates obesity-induced inflammation and insulin resistance[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(14): 5753-5758.
- [22] BECATTINI B, MARONE R, ZANI F, et al. PI3K γ within a nonhematopoietic cell type negatively regulates diet-induced thermogenesis and promotes obesity and insulin resistance [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(42): E854-863.
- [23] GIACCARI C, ANTONOULI S, ANIFANDIS G, et al. An update on physiopathological roles of Akt in the ReprodAKTive mammalian ovary [J]. *Life*, 2024, 14(6): 722.
- [24] ABDI A, RANJBARAN M, AMIDI F, et al. The effect of adipose-derived mesenchymal stem cell transplantation on ovarian mitochondrial dysfunction in letrozole-induced polycystic ovary syndrome in rats: the role of PI3K-AKT signaling pathway [J]. *J Ovarian Res*, 2024, 17(1): 91.
- [25] LI M, GAO S, KANG M, et al. Quercitrin alleviates lipid metabolism disorder in polycystic ovary syndrome-insulin resistance by upregulating PM20D1 in the PI3K/Akt pathway [J].

- Phytomedicine, 2023, 117:154908.
- [26] RABAH H M, MOHAMED D A, MARIAH R A, et al. Novel insights into the synergistic effects of selenium nanoparticles and metformin in treatment of letrozole-induced polycystic ovarian syndrome: targeting PI3K/Akt signaling pathway, redox status and mitochondrial dysfunction in ovarian tissue[J]. Redox Rep, 2023, 28(1):2160569.
- [27] BAZUHAIR M A, ALGHAMDI A A, BAOTHMAN O, et al. Chemical analogue based drug design for cancer treatment targeting PI3K: integrating machine learning and molecular modeling[J]. Mol Divers, 2024, 28(4):2345-2364.
- [28] KATAN M, COCKCROFT S. Phosphatidylinositol (4,5)bisphosphate: diverse functions at the plasma membrane[J]. Essays Biochem, 2020, 64(3):513-531.
- [29] LI Y Z, Di CRISTOFANO A, WOO M. Metabolic role of PTEN in insulin signaling and resistance[J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2020, 10(8):a036137.
- [30] FERREIRA A S, MACEDO C, SILVA A M, et al. Natural products for the prevention and treatment of oral mucositis: a review[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(8):4385.
- [31] ZHANG H W, HU J J, FU R Q, et al. Flavonoids inhibit cell proliferation and induce apoptosis and autophagy through downregulation of PI3K γ mediated PI3K/AKT/mTOR/p70S6K/ULK signaling pathway in human breast cancer cells[J]. Sci Rep, 2018, 8(1):11255.
- [32] FENG L, LI B, XI Y, et al. Aerobic exercise and resistance exercise alleviate skeletal muscle atrophy through IGF-1/IGF-1R-PI3K/Akt pathway in mice with myocardial infarction[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2022, 322(2):C164-176.
- [33] WANG K, LI Y. Signaling pathways and targeted therapeutic strategies for polycystic ovary syndrome[J]. Front Endocrinol, 2023, 14:1191759.
- [34] TAN M, CHENG Y, ZHONG X, et al. LNK promotes granulosa cell apoptosis in PCOS via negatively regulating insulin-stimulated AKT-FOXO3 pathway[J]. Aging, 2021, 13(3):4617-4633.
- [35] XU R, WANG Z. Involvement of transcription factor FoxO1 in the pathogenesis of polycystic ovary syndrome[J]. Front Physiol, 2021, 12:649295.
- [36] BECATTINI B, BREASSON L, SARDI C, et al. PI3K γ promotes obesity-associated hepatocellular carcinoma by regulating metabolism and inflammation[J]. JHEP Rep, 2021, 3(6):100359.
- [37] BREASSON L, SARDI C, BECATTINI B, et al. PI3K γ ablation does not promote diabetes in db/db mice, but improves insulin sensitivity and reduces pancreatic β -cell apoptosis[J]. FASEB J, 2018, 32(1):319-329.
- [38] JIN X, CHU Q, SUN L, et al. Phosphoinositide 3 Kinase γ plays a critical role in acute kidney injury[J]. Cells, 2022, 11(5):772.
- [39] YIN X, WANG J, GE M, et al. Designing small molecule PI3K γ inhibitors: a review of structure-based methods and computational approaches[J]. J Med Chem, 2024, 67(13):10530-10547.
- [40] LANAHAN S M, WYMAN M P, LUCAS C L. The role of PI3K γ in the immune system: new insights and translational implications[J]. Nat Rev Immunol, 2022, 22(11):687-700.

(收稿日期:2025-01-28 修回日期:2025-04-28)

(编辑:管佩钰)