

## PCSK9 在多囊卵巢综合征卵巢颗粒细胞中的表达研究

曾镜霖, 彭娟, 向琼, 雷小灿, 唐志晗

(南华大学心血管疾病研究所 动脉硬化化学湖南省重点实验室 湖南省动脉硬化性疾病国际科技创新合作基地 南华大学衡阳医学院, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 前蛋白转化酶枯草溶菌素 9; 多囊卵巢综合征; 颗粒细胞; 低密度脂蛋白受体; 脂质代谢

[摘要] **目的** 研究前蛋白转化酶枯草溶菌素 9(PCSK9) 在多囊卵巢综合征(PCOS) 卵巢颗粒细胞中的表达情况, 并探讨 PCSK9 表达与 PCOS 卵巢组织以及睾酮处理的 KGN 细胞中脂质状况的关系。**方法** 通过来曲唑联合高脂饲料喂养构建 PCOS 大鼠模型, 油红 O 染色观察 PCOS 大鼠卵巢组织中脂质分布情况; 生物信息学分析筛选 PCOS 卵巢与正常卵巢转录组数据中参与脂质代谢通路的差异表达基因; 采用免疫组织化学和 Western blot 技术检测 PCSK9 蛋白在 PCOS 卵巢组织中的表达情况; 采用免疫荧光、qRT-PCR 和 Western blot 技术检测不同浓度睾酮处理的 KGN 细胞中 PCSK9 和低密度脂蛋白受体(LDLR) 的表达差异; 免疫荧光显微镜观察 KGN 细胞对 Dil-LDL 的摄取能力。**结果** 油红 O 染色结果显示 PCOS 卵巢组织中颗粒细胞上的脂滴分布较正常卵巢组织明显减少; 生物信息学分析结果显示 PCOS 大鼠卵巢组织中上调的 PCSK9 主要参与胆固醇代谢通路; 免疫组织化学和 Western blot 结果显示 PCSK9 蛋白主要定位于颗粒细胞且在 PCOS 大鼠颗粒细胞中表达增加; 免疫荧光、qRT-PCR 和 Western blot 结果显示 KGN 细胞中 PCSK9 的表达随睾酮浓度的增加而增加, LDLR 的表达随睾酮浓度的增加而减少; 睾酮(100 nmol/L) 可减弱 KGN 细胞对 Dil-LDL 的摄取能力。**结论** PCSK9 在 PCOS 卵巢颗粒细胞中高表达, 其可导致 LDLR 蛋白表达降低, 使颗粒细胞脂质摄取不足。

[中图分类号] R5;R363

[文献标识码] A

### Study on the expression of PCSK9 in ovarian granulosa cells with polycystic ovary syndrome

ZENG Jinglin, PENG Juan, XIANG Qiong, LEI Xiaocan, TANG Zhihan

(Institute of Cardiovascular Disease, University of South China & Key Laboratory for Arteriosclerosis of Hunan Province & Human International Scientific and Technological Cooperation Base of Arteriosclerotic Disease & Hengyang Medical College, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] proprotein convertase subtilisin kexin 9; polycystic ovary syndrome; granulosa cells; low density lipoprotein receptor; lipid metabolism

[ABSTRACT] **Aim** To explore the expression of proprotein convertase subtilisin kexin 9 (PCSK9) in polycystic ovary syndrome (PCOS) ovarian granulosa cells, and the relationship between PCSK9 expression and the lipid status of PCOS ovarian tissue and testosterone-treated KGN cells. **Methods** A rat model of PCOS was constructed by letrozole combined with high-fat diet. Oil red O staining was used to observe the lipid distribution in the ovarian tissue of PCOS rats. Transcriptome data from PCOS ovarian tissue and normal ovarian tissue was analyzed by bioinformatics, and the differentially expressed genes involved in lipid metabolism pathway were screened. Western blot and immunohistochemical techniques were used to detect the protein expression of PCSK9 in PCOS rat tissues. Immunofluorescence, qRT-PCR and Western blot techniques were used to detect the expression differences of PCSK9 and low density lipoprotein receptor (LDLR) in KGN cells treated with different concentrations of testosterone. Immunofluorescence microscope was used to observe the ability of KGN cells uptake Dil-LDL. **Results** The results of Oil Red O staining showed that the distribu-

[收稿日期] 2021-04-20

[修回日期] 2021-05-20

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81770454); 湖南省卫健委 2020 年重点指导课题(20201905)

[作者简介] 曾镜霖, 硕士研究生, 研究方向为脂代谢紊乱的发生机制与防治, E-mail 为 15707495597@163.com。唐志晗, 医学博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为脂代谢紊乱的发生机制与防治, E-mail 为 9906430@qq.com。

tion of lipid droplets in granular cells of PCOS ovarian tissue was significantly less than that of normal ovarian tissue. The results of bioinformatics analysis showed that the up-regulated expression of PCSK9 in the ovarian tissue of PCOS rats was mainly involved in the cholesterol metabolism pathway. The results of immunohistochemistry and Western blot showed that the PCSK9 protein was mainly localized in granulosa cells and its expression increased in the granulosa cells of PCOS rats. The results of immunofluorescence, qRT-PCR and Western blot showed that PCSK9 expression was up-regulated with the increased concentration of testosterone, and LDLR expression was decreased with the increased concentration of testosterone in KGN cells. Testosterone (100 nmol/L) could reduce the uptake of Dil-LDL by KGN cells. **Conclusion** PCSK9 was highly expressed in PCOS ovarian granulosa cells, which could reduce the expression of LDLR protein and lead to insufficient lipid uptake of granulosa cells.

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 是一种育龄期女性常见的内分泌代谢疾病, 其临床主要特征是月经不调、高雄激素血症、卵巢多囊样改变等, 是导致女性不孕的重要疾病之一<sup>[1-2]</sup>。超过 50% PCOS 的患者伴随有肥胖体征、血脂异常, 与远期并发动脉粥样硬化的风险高度相关<sup>[3-4]</sup>。卵泡发育障碍是 PCOS 导致女性不育的重要原因之一, 而脂质的充分供应是卵泡生长发育、维持内分泌稳态的必要基础<sup>[5]</sup>。胆固醇作为体内脂质的主要成分, 不仅参与细胞膜的构成, 还是体内各种类固醇激素合成的前体物质<sup>[6]</sup>。研究表明血浆脂蛋白是卵巢类固醇激素合成所需胆固醇的重要来源, 血浆脂蛋白可通过卵泡屏障进入卵泡液, 也可被卵巢间质细胞和颗粒细胞直接吸收<sup>[7-8]</sup>。因此, 维持卵巢组织脂代谢稳态对改善 PCOS 卵泡发育障碍具有重要意义。

研究显示前蛋白转化酶枯草溶菌素酶 9 (proprotein convertase subtilisin kexin 9, PCSK9) 是参与调控机体胆固醇代谢的重要因子之一, PCSK9 通常与肝细胞表面的低密度脂蛋白受体 (low density lipoprotein receptor, LDLR) 结合, 摄取血浆中的低密度脂蛋白胆固醇, 在溶酶体内降解, 可作为预防动脉粥样硬化发生发展的生物靶标<sup>[9-10]</sup>。最新的研究发现, PCOS 患者血清中 PCSK9 的表达水平显著升高<sup>[11]</sup>, 且高水平的 PCSK9 与 PCOS 患者的体质指数、脂代谢指标如胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇呈正相关, 与高密度脂蛋白胆固醇呈负相关<sup>[12]</sup>。但 PCSK9 在 PCOS 卵巢组织局部的表达情况及作用尚不清楚。本研究以 PCOS 大鼠模型和睾酮处理的人卵巢颗粒细胞 (KGN 细胞) 为实验对象, 探讨 PCSK9 在 PCOS 卵巢颗粒细胞中的表达情况, 并分析 PCSK9 表达与 PCOS 卵巢组织以及睾酮处理的 KGN 细胞中脂质状况的关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与试剂

来曲唑片购自江苏恒瑞医药股份有限公司; 实验室配制的高脂饮食; 油红 O 购自 Sigma 公司; 苏木精、4% 多聚甲醛通用组织固定液购自 Biosharp 公司; PCSK9 抗体购自 ABclonal 公司; LDLR 抗体、过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (H+L)、CY3 标记的羊抗兔 IgG (H+L) 购自 Proteintech 公司; Dil-LDL 购自广州奕源有限公司; DAPI 购自 Solarbio 公司。

### 1.2 PCOS 大鼠模型的制备

根据参考文献<sup>[13-14]</sup>, 将 5 周龄大小的 20 只雌性 SD 大鼠随机分为对照组和 PCOS 组, 每组 10 只, 适应性培养 7 天后进行后续实验。用普通饲料喂养对照组, 用 1% 羧甲基纤维素溶解 1 mg/(kg·d) 来曲唑联合高脂饲料灌胃 30 天以构建 PCOS 模型组。动物实验方案经南华大学实验动物伦理委员会批准。

### 1.3 油红 O 染色分析脂质分布

制备卵巢冰冻切片, 用提前稀释好的油红 O 染色液滴加在卵巢组织上, 迅速放入 65 °C 烤箱, 去掉染液, 乙醇分化后, 苏木精复染, 蒸馏水冲洗, 烘干, 甘油封片, 镜下检测。

### 1.4 PCOS 大鼠卵巢组织转录组测序生物信息学分析

通过分析 PCOS 大鼠卵巢组织转录组学的数据库, 筛选差异表达的脂代谢相关基因, 随后采用带有 Heatmap 软件包的 R 软件进行数据预处理, 包括背景校正、标准化、对数转换和筛选。统计显著性差异被定义为  $\log_2(FC) > 1$  或  $\log_2(FC) < -1$  (FC, 折叠变化) 和校正后的  $P < 0.05$ 。

### 1.5 免疫组织化学检测 PCSK9 的表达情况

将卵巢组织的石蜡切片置于恒温烤箱烘烤, 脱蜡水化, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温孵育后, 蒸馏水冲洗 3 次, 每次 5 min, 然后进行抗原修复, 室温冷却后, 用常规血

清进行封闭,PCSK9(1:100)4℃孵育过夜,PBS冲洗3次,每次5min,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG(H+L)(1:100)室温孵育2h,PBS冲洗3次,每次5min,蒸馏水迅速冲洗3次,DAB显色后,苏木精室温复染后,自来水迅速冲洗,盐酸乙醇分化后返蓝,经脱水透明后,中性树脂封片,镜下检测。

### 1.6 细胞培养及处理

KGN细胞系在37℃恒温水浴中30s内快速解冻,严格按照无菌操作转入细胞培养瓶中培养,在含10%FBS的DMEM培养基中,于37℃,5%CO<sub>2</sub>培养箱中静置培养,根据细胞的生长状态,每2天更换培养基1次,待细胞融合度为80%时,用含有EDTA的胰蛋白酶消化液将细胞进行传代培养,当细胞传代培养3代以上时,选取细胞状态最好的一代贴壁细胞加入不同浓度(0、25、50、100及200nmol/L)的睾酮培养24h,进行后续实验。

### 1.7 人KGN细胞DiI-LDL摄取实验

将传代细胞接种于6孔板中,待细胞贴壁后,添加睾酮培养24h,避光加入20mg/L DiI-LDL,继续培养4h。取出细胞用磷酸盐缓冲液洗3次,用DAPI染核,PBS洗3次后,于荧光显微镜下拍摄。

### 1.8 细胞免疫荧光观察PCSK9、LDLR表达

从培养箱取出细胞,用磷酸盐缓冲液洗3次,用4%多聚甲醛固定液固定30min,PBS洗3次,用0.1%TX-100透膜30min,磷酸盐缓冲液洗3次,用10%FBS室温封闭1h,用PCSK9(1:100)、LDLR(1:100)4℃孵育过夜,磷酸盐缓冲液洗3次,用CY3标记的羊抗兔IgG(H+L)(1:100)室温孵育2h,PBS洗3次,用DAPI染核,PBS洗3次后,于荧光显微镜下拍摄。

### 1.9 Western blot 检测

将大鼠卵巢组织剪碎,研磨,用RIPA裂解,离心收集组织蛋白;用配制的细胞裂解液裂解细胞后,离心收集上清,得到细胞蛋白,经SDS-PAGE分离样品,封闭后,用PCSK9(1:1000)、LDLR(1:2000)、GAPDH(1:4000)4℃孵育过夜,TBST漂洗3次,每次10min,室温孵育辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG(H+L)(1:8000)80min,TBST缓冲液漂洗3次,每次10min,借助eECL显影剂用化学发光系统显示图像并使用GraphPad Prism 8、Image J统计软件分析。

### 1.10 qRT-PCR 检测

根据Trizol试剂盒说明书提取总RNA,反转录成cDNA,再进行PCR循环扩增。其引物序列见表

1。取反转录产物进行qRT-PCR。反应体系为20μL,按步骤向八连管中加入的物质有2×Super Real Pre Mix Plus、模板、正反向引物、无酶水,体积分别为10μL、1μL、1μL、1μL、7μL。短暂离心,确保各物质沉于管底。所用机型为罗氏,设置好参数,接着将反应体系置于PCR仪中进行反应。

表1. LDLR、PCSK9和GAPDH引物序列

Table 1. LDLR, PCSK9 and GAPDH primer sequences

基因	引物序列
PCSK9	Forward 5'-GCTGCCACTGCTGCTGCTG-3'
	Reverse 5'-CTCCTCGTAGTCGCCGTCCTC-3'
LDLR	Forward 5'-GACTGGTCAGATGAACCCATCAAAG-3'
	Reverse 5'-AGGTCATTGCAGACGTGGGAAC-3'
GAPDH	Forward 5'-CAGGAGGCATTGCTGATGAT-3'
	Reverse 5'-GAAGGCTGGGGCTCATTT-3'

### 1.11 统计学分析

所有的实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用GraphPad Prism 8、Image J统计软件进行数据分析,采用单因素方差分析及t检验分析组间差异, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 PCOS大鼠卵巢组织中脂质分布情况

油红O染色结果显示,红染脂滴多分布于卵巢组织的卵泡膜间质细胞、卵泡膜细胞及颗粒细胞。与对照组相比,PCOS的卵巢组织颗粒细胞上的脂滴分布明显减少(图1)。

### 2.2 PCOS大鼠卵巢组织中PCSK9的表达情况

用生物信息学方法对两组大鼠卵巢组织的转录组数据进行筛选分析,结果显示,与对照组比较,Abcc4、Abca1、PCSK6、Abca6、PCSK9、Hnf1a等基因在PCOS中存在差异表达(图2A)。富集分析结果显示,差异表达基因涉及的信号通路主要集中在与胆固醇代谢、脂质消化与吸收、脂质和动脉粥样硬化等相关的通路(图2B)。PCSK9是筛选出的上调基因之一。免疫组织化学检测结果显示,PCSK9主要定位于颗粒细胞中;与对照组相比,PCOS大鼠卵巢组织中PCSK9的表达水平增加(图2C-2F)。Western blot检测结果进一步证实,与对照组比较,PCOS大鼠卵巢组织中PCSK9蛋白水平显著增加(图2G-2F)。

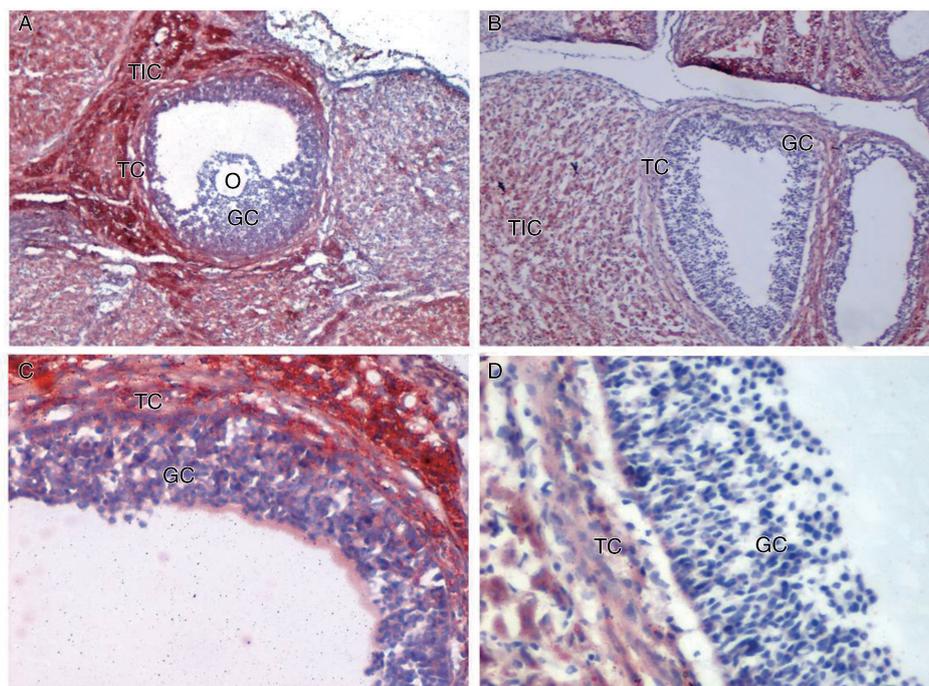


图 1. 两组大鼠卵巢组织中脂质含量与分布情况比较

A 和 C 为对照组, B 和 D 为 PCOS 组; A 和 B:  $\times 100$ , C 和 D:  $\times 400$ ;  
TIC: 卵泡膜间质细胞, TC: 卵泡膜细胞, GC: 颗粒细胞, O: 卵母细胞。

Figure 1. Comparison of lipid content and distribution in rat ovarian tissues of the two groups

### 2.3 睾酮上调 KGN 细胞中 PCSK9 的表达水平

为了进一步探讨 PCOS 状态下卵巢颗粒细胞 PCSK9 表达的变化, 选取浓度为 0、25、50、100 及 200 nmol/L 睾酮分别处理 KGN 细胞 24 h, 免疫荧光检测结果显示 PCSK9 呈现的红色荧光强度随睾酮浓度的升高而增加 (图 3A-3E)。qRT-PCR 和 Western blot 检测结果显示, PCSK9 mRNA 和蛋白的表达水平随睾酮浓度增加而升高, 并在 100 nmol/L 时达到峰值 (图 3F-3H), 其结果与免疫荧光结果一致。

### 2.4 睾酮下调 KGN 细胞中 LDLR 表达并减少 Dil-LDL 摄取

PCSK9 可在蛋白水平降解 LDLR, LDLR 是细胞负责摄取 LDL 的主要受体。0、25、50、100 及 200 nmol/L 睾酮分别处理 KGN 细胞 24 h, 免疫荧光检测结果显示, LDLR 呈现的红色荧光强度随睾酮浓度的升高而逐渐减弱 (图 4A-4E)。qRT-PCR 和 Western blot 检测结果显示, LDLR mRNA 和蛋白的表达水平随睾酮浓度增加而降低 (图 4C-4D), 其结果与免疫荧光结果一致。

100 nmol/L 睾酮处理 KGN 细胞 24 h, 再加入 Dil-LDL 处理 4 h, 荧光显微镜观察结果显示, 与单

纯 Dil-LDL 处理组比较, 睾酮+Dil-LDL 处理组 KGN 细胞内红色荧光强度明显减弱, 表明其摄取 Dil-LDL 减少 (图 4I-4K)。

## 3 讨论

临床上 PCOS 患者常常表现出肥胖、代谢紊乱, 并伴有心血管疾病发生的风险, 血脂代谢异常是 PCOS 患者最典型的表现。目前, 血脂代谢异常已被证实可诱发生殖并发症<sup>[15]</sup>。有报道表明, 约 36% 的 PCOS 患者表现高胆固醇血症<sup>[16-17]</sup>, 这可能与 PCOS 患者有较高的心血管疾病风险有关, 但 PCOS 卵巢局部的脂质状态情况尚不明确。本研究中, 通过采用来曲唑联合高脂饮食诱导建立了 PCOS 大鼠模型, 油红 O 染色观察到 PCOS 大鼠卵巢组织脂质主要分布在卵泡膜间质细胞、卵泡膜细胞及颗粒细胞, 与正常大鼠相比, PCOS 的卵巢组织中卵泡膜细胞、颗粒细胞中的脂质明显减少, 这提示 PCOS 大鼠卵巢组织的脂质稳态受到了损害。

PCOS 患者常常表现出肥胖和胰岛素抵抗等异常, 而血脂异常可能是转化这些代谢效应的中间环节。PCOS 患者的血脂异常可能与激素紊乱和心血

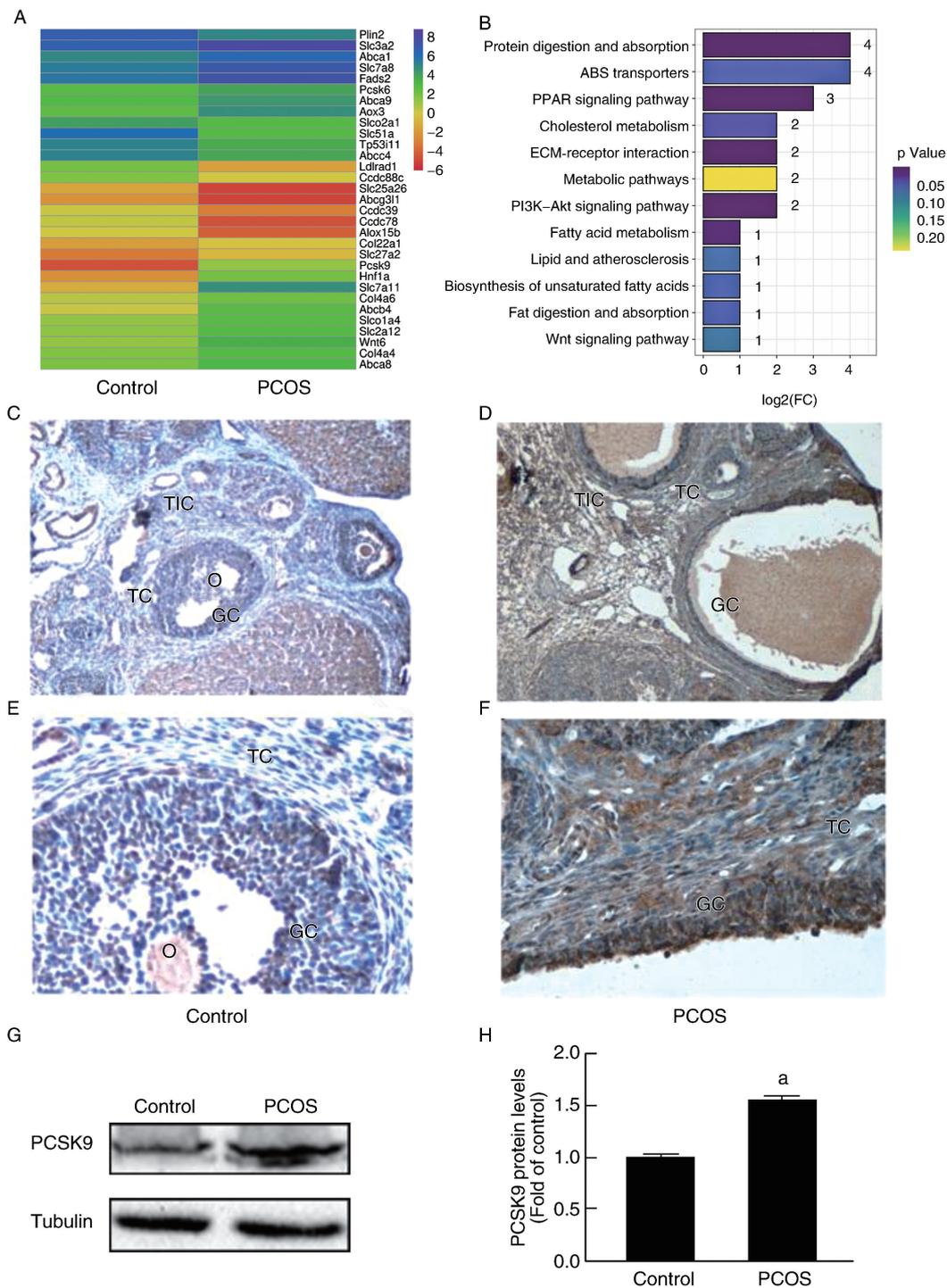


图 2. PCOS 大鼠卵巢组织中 PCSK9 的表达情况

A 为大鼠卵巢组织中脂质代谢表达差异基因分析热图, B 为聚类富集分析结果, C-F 为两组大鼠卵巢组织切片 PCSK9 免疫组织化学分析结果, C 和 E 为对照组, D 和 F 为 PCOS 组, C 和 D: ×100, E 和 F: ×400; G-H 为 Western blot 检测结果 (n=3)。a 为 P<0.01, 与对照组相比。

Figure 2. PCSK9 expression in ovarian tissue of PCOS rats

管疾病发展风险增加有关。而 PCOS 大鼠卵巢组织局部脂质代谢紊乱也会影响卵巢的功能<sup>[18]</sup>, 因此阐明 PCOS 大鼠卵巢组织局部脂质代谢失衡的分子机制具有重要意义。本研究检测到 PCOS 大鼠卵巢组

织中 PCSK9 的表达增加。有研究显示 PCOS 患者的血清 PCSK9 含量也出现增加<sup>[19]</sup>。PCSK9 是一个重要的脂质代谢调节分子, 其可通过靶向溶酶体降解途径下调 LDLR 蛋白表达, 从而影响局部组织细

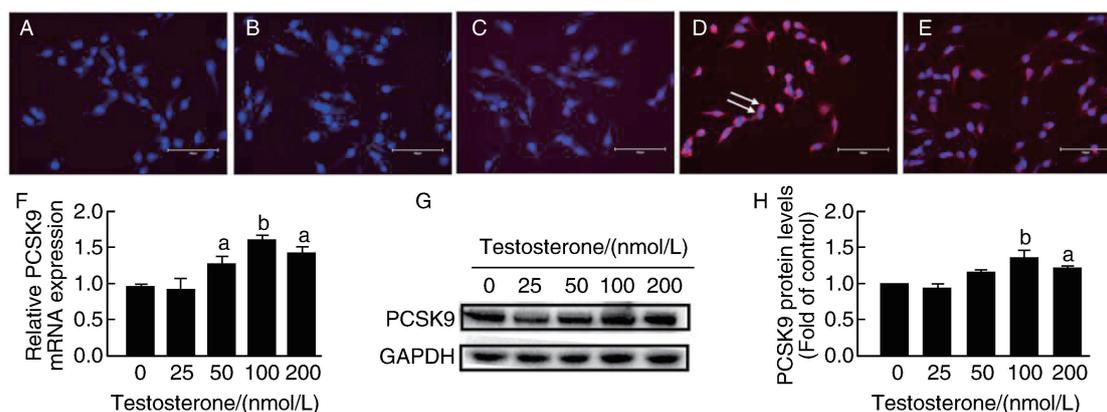


图 3. 睾酮上调 KGN 细胞中 PCSK9 mRNA 和蛋白的表达

A-E 为免疫荧光观察结果,分别为 0、25、50、100 及 200 nmol/L 睾酮处理组,红色荧光示 PCSK9,蓝色荧光示细胞核,Bar=150  $\mu$ m;F 为 qRT-PCR 检测结果( $n=3$ );G-H 为 Western blot 检测结果( $n=3$ )。

a 为  $P<0.05$ ,b 为  $P<0.01$ ,与 0 nmol/L 睾酮处理组比较。

Figure 3. Testosterone up-regulates PCSK9 mRNA and protein expression in KGN cells

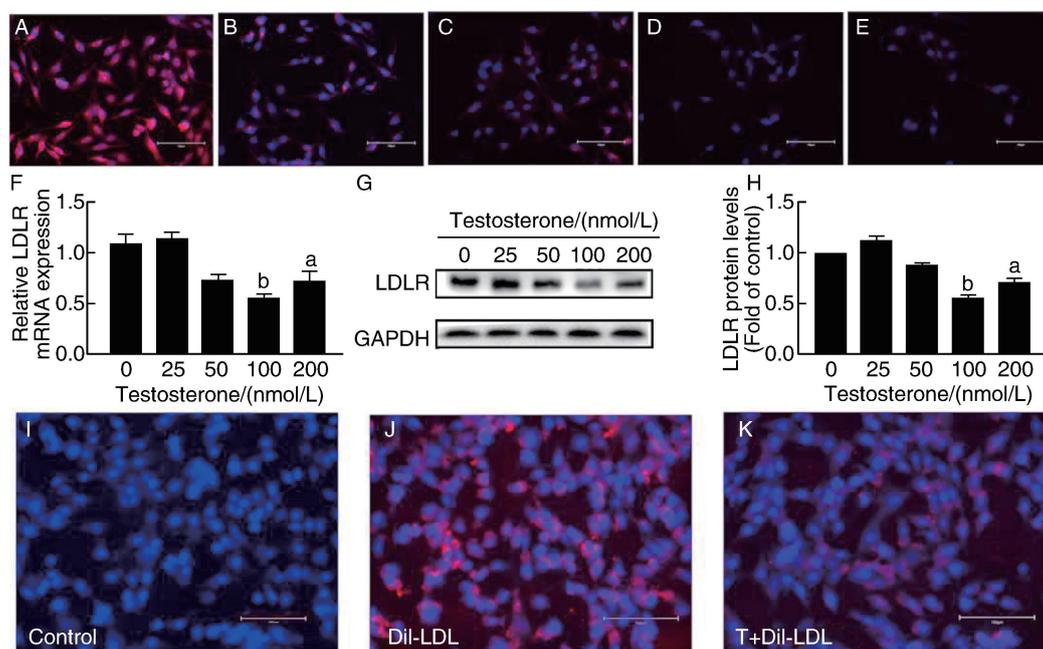


图 4. 睾酮下调 KGN 细胞中 LDLR mRNA 和蛋白的表达并减少 Dil-LDL 摄取

A-E 为免疫荧光观察结果,分别为 0、25、50、100 及 200 nmol/L 睾酮处理组,红色荧光示 LDLR,蓝色荧光示细胞核,Bar=150  $\mu$ m;F 为 qRT-PCR 检测结果( $n=3$ );G-H 为 Western blot 检测结果( $n=3$ );I-K 为 KGN 细胞摄取 Dil-LDL 荧光显微镜观察结果,I 为对照组,J 为 Dil-LDL 处理组,K 为睾酮+Dil-LDL 处理组,蓝色荧光示细胞核,红色荧光示 Dil-LDL,Bar=150  $\mu$ m。a 为  $P<0.05$ ,b 为  $P<0.01$ ,与 0 nmol/L 睾酮处理组比较。

Figure 4. Testosterone down-regulates LDLR mRNA and protein expression in KGN cells and reduces Dil-LDL uptake

胞对 LDLC 的摄取。PCOS 大鼠卵巢组织脂质含量减少可能与局部 PCSK9 表达增加有关。

高雄激素血症是 PCOS 患者临床表现的重要指征之一,高雄激素抑制了雌激素的生成,同时刺激炎症巨噬细胞向颗粒细胞聚集,促进卵泡凋亡和多

囊性卵泡形成<sup>[20]</sup>。有研究表明睾酮可使肝细胞中 PCSK9 表达上调,LDLR 表达下调<sup>[21]</sup>。本研究发现睾酮处理颗粒细胞后,颗粒细胞中 PCSK9 表达上调,LDLR 表达下调;同时颗粒细胞对 LDL 的摄取也明显减少。这些结果表明 PCOS 卵巢颗粒细胞中

PCSK9 表达上调,会引起颗粒细胞脂质吸收减少。而卵巢颗粒细胞摄取 LDLC 不足,将无法合成卵泡发育所需要的类固醇,导致卵泡多囊形态,无法正常排出,使卵巢功能失调<sup>[22]</sup>。这些结果提示颗粒细胞中 PCSK9 表达上调可能参与了 PCOS 的发生发展。

综上所述,本研究发现 PCSK9 在 PCOS 大鼠卵巢颗粒细胞以及睾酮处理的人卵巢颗粒细胞中均呈现高表达,而 PCSK9 高表达可导致 LDLR 蛋白表达降低,使颗粒细胞脂质摄取不足,从而影响卵泡发育。因此,PCSK9 有望成为 PCOS 一个新的潜在防治靶点。

#### [参考文献]

- [1] HARRISON C L, TEEDE H J, JOHAM A E, et al. Breastfeeding and obesity in PCOS[J]. *Expert Rev Endocrinol Metab*, 2016, 11(6): 449-454.
- [2] PEDERSEN A J T, STAGE T B, GLINTBORG D, et al. The pharmacogenetics of metformin in women with polycystic ovary syndrome: a randomized trial[J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2018, 122(2): 239-244.
- [3] BARGIOTA A, DIAMANTI-KANDARAKIS E. The effects of old, new and emerging medicines on metabolic aberrations in PCOS[J]. *Ther Adv Endocrinol Metab*, 2012, 3(1): 27-47.
- [4] VINE D F, WANG Y, JETHA M M, et al. Impaired apoB-lipoprotein and triglyceride metabolism in obese adolescents with polycystic ovary syndrome[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2017, 102(3): 970-982.
- [5] LV X, HE C, HUANG C, et al. Timely expression and activation of YAP1 in granulosa cells is essential for ovarian follicle development[J]. *FASEB J*, 2019, 33(9): 10049-10064.
- [6] HU J, ZHANG Z, SHEN W J, et al. Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones[J]. *Nutr Metab (Lond)*, 2010, 7: 47.
- [7] AZHAR S, LEERS-SUCHETA S, REAVEN E. Cholesterol uptake in adrenal and gonadal tissues: the SR-BI and 'selective' pathway connection[J]. *Front Biosci*, 2003, 8: s998-s1029.
- [8] FUJIMOTO V Y, KANE J P, ISHIDA B Y, et al. High-density lipoprotein metabolism and the human embryo[J]. *Hum Reprod Update*, 2010, 16(1): 20-38.
- [9] 武春艳, 江璐, 唐志哈, 等. PCSK9 调控氧化型低密度脂蛋白诱导的 THP-1 源性巨噬细胞凋亡的机制[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009, 17(7): 587.
- [10] 冯若男, 周华. PCSK9 与动脉粥样硬化性心血管疾病的研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2020, 28(12): 1095-1099.
- [11] WANG M, ZHAO D, XU L, et al. Role of PCSK9 in lipid metabolic disorders and ovarian dysfunction in polycystic ovary syndrome[J]. *Metabolism*, 2019, 94: 47-58.
- [12] BERNEIS K, RIZZO M, LAZZARINI V, et al. Atherogenic lipoprotein phenotype and low-density lipoproteins size and subclasses in women with polycystic ovary syndrome[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007, 92(2): 482.
- [13] 蔡云, 许昕. 来曲唑联合高脂饲料建立 PCOS-IR 大鼠模型实验研究[J]. *首都医科大学学报*, 2017, 38(2): 244-248.
- [14] KAFALI H, IRIADAM M, OZARDALI I, et al. Letrozole-induced polycystic ovaries in the rat: a new model for cystic ovarian disease[J]. *Arch Med Res*, 2004, 35(2): 103-108.
- [15] 黎红芳. 多囊卵巢综合症脂代谢情况的研究[D]. 广西医科大学, 2009.
- [16] BADAWY A, STATE O, El GAWAD SSA, et al. Plasma homocysteine and polycystic ovary syndrome: the missed link[J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2007, 131(1): 68-72.
- [17] SCHACHTER M, RAZIEL A, FRIEDLER S, et al. Insulin resistance in patients with polycystic ovary syndrome is associated with elevated plasma homocysteine[J]. *Hum Reprod*, 2003, 18(4): 721-727.
- [18] 孙立峰. 脂代谢相关分子 Col6a5 和 Gpr1 在高雄激素化小鼠中的作用及其机理[D]. 中国科学院大学(中国科学院深圳先进技术研究院), 2019.
- [19] XAVIER L B, SÓTER M O, SALES M F, et al. Evaluation of PCSK9 levels and its genetic polymorphisms in women with polycystic ovary syndrome[J]. *Gene*, 2018, 644: 129-136.
- [20] LIMA PDA, NIVET AL, WANG Q, et al. Polycystic ovary syndrome: possible involvement of androgen-induced, chemerin-mediated ovarian recruitment of monocytes/macrophages[J]. *Biol Reprod*, 2018, 99(4): 838-852.
- [21] MONDAL K, CHAKRABORTY P, KABIR S N. Hyperhomocysteinemia and hyperandrogenemia share PCSK9-LDLR pathway to disrupt lipid homeostasis in PCOS[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(1): 8-13.
- [22] 杨珅, 姚桂东, 孙莹璞. 颗粒细胞 Lnc-ADAMTS1-1:1 的表达与 PCOS 患者脂代谢及胚胎质量的相关性[J]. *河南医学研究*, 2020, 29(15): 2689-2693.

(此文编辑 文玉珊)