

- 大鼠颗粒细胞自噬影响的实验研究[J]. 北京中医药, 2011, 30(3): 235-238
- 14 牛煜, 林颖珣. 补肾活血中药替代促排卵药 HCG 预防 OHSS 的临床观察[J]. 中医临床研究, 2013, 5(16): 29-30
- 15 Rashidi BH, Tehrani ES, Hamedani NA, *et al.* Effects of acupuncture on the outcome of in vitro fertilisation and intracytoplasmic sperm injection in women with polycystic ovarian syndrome[J]. *Acupuncture in Medicine*, 2013, 31(2): 151-156
- 16 张玲. 养泡汤联合来曲唑治疗多囊卵巢综合征(脾肾两虚证)的临床观察[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2013
- 17 刘艳巧. 刘润侠教授治疗多囊卵巢综合征不孕的学术思想和临床经验研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2012
- 18 孙永忠. 中西医结合治疗多囊卵巢综合征不孕症临床观察[J]. 浙江中医药大学学报, 2009, 33(3): 344-345
- 19 黎小斌, 李丽芸. 腹腔镜手术辅以补肾化痰中药治疗多囊卵巢综合征[J]. 中药新药与临床药理, 2002, 13(2): 75-76
- 20 Franks S, McCarthy MI, Hardy K. Development of polycystic ovary syndrome: involvement of genetic and environmental factors[J]. *International Journal of Andrology*, 2006, 29(1): 278-285
- 21 王芳, 杨文静, 李英勇. 孕期高雄激素环境对 SD 大鼠仔代体重及 OGTT 的影响[J]. 现代妇产科进展, 2009, 18(11): 813-815
- (收稿日期: 2014-08-28)
- (修回日期: 2014-10-16)

卵巢 microRNAs 研究进展和应用前景

祝雨田 张副兴 丁彩飞

摘要 微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类真核生物内源性小分子单链 RNA, 长约 21~25 个核苷酸的非编码 RNA, 通过结合到 mRNA 的 3' 非编码区 (3' UTR), 降解 mRNA 或者抑制其翻译过程, 从而抑制转录后基因表达。研究发现 miRNA 在卵巢的生长发育、内分泌、肿瘤形成等过程中起到了重要作用, miRNA 对于阐明卵巢疾病机制也起到了重要作用。本文对卵巢相关 miRNA 研究中的进展及应用前景做如下报道。

关键词 卵巢 microRNA

中图分类号 R711

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.04.004

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类真核生物内源性小分子单链 RNA, 是长约 21~25 个核苷酸的非编码 RNA, 通过结合到 mRNA 的 3' 非编码区 (3' UTR) 降解 mRNA 或者抑制其翻译过程, 从而抑制转录后的基因表达。20 余年前, Ambro 和 Ruvkun 实验室发现了该类内源性小分子单链 RNA, 从此开启了对 miRNA 的深入研究, 并逐渐转向临床应用, 因此具有广泛的应用前景^[1]。众多研究表明, miRNA 在生殖系统中的各个器官有丰富的表达, 其在卵巢的生长、发育、内分泌、肿瘤生成等各方面均起到了极其重要的作用。

一、miRNA 与卵巢的分化、生长发育、闭锁等过程紧密联系

miRNA 与卵巢腺体的分化密切相关。Real 等^[2]

筛选出了卵巢发育相关潜在靶基因 miR-124, 通过敲除或过表达原始性腺细胞中 miR-124, 发现 miR-124 可抑制卵巢细胞 SOX9 的转录和翻译, 首次证明了 miRNA 与调节性腺发育控制基因和性别发育相关。在两性分化过程中, 分化性别不同, miRNA 的表达水平不同, Bannister 等^[3]发现鸡胚性腺分化向雄性分化时, miR-202 表达上调, 可作为睾丸分化的特征性 miRNA。通过调节雌激素水平引起雄性性腺雌性化逆转, 可使 miR-202 的表达下调, 同样雌性性腺在应用芳香化酶抑制剂抑制雌激素合成后, miR-202 的表达增加, 进一步研究发现 miR-202 表达下调与睾丸相关基因 DMRT1 和 SOX9 表达下调相关, miR-202 表达下调与卵巢相关基因 FOXL2 和芳香化酶 CYP19A1 上调相关。

研究表明 miRNA 在卵泡形成过程中起重要作用。Zhang 等^[4]研究了 miR-143 在鼠始基卵泡形成过程中起到的重要作用, 从性交后 15.5 天到产后 4 天, RT-PCR 显示在始基卵泡形成过程中 miR-143 表达增加, 原位杂交技术显示 miR-143 定位于前颗粒细胞, miR-143 通过抑制细胞增生和下调细胞周

基金项目: 浙江省省级公益性技术应用研究计划项目 (2012C33103)

作者单位: 310000 杭州, 浙江中医药大学第三临床医学院 (祝雨田); 浙江中医药大学第二临床医学院 (张副兴); 浙江省中西医结合医院生殖医学科 (丁彩飞)

通讯作者: 丁彩飞, 电子信箱: dingcaifei@163.com

期相关基因表达,从而抑制始基卵泡形成。以上研究说明 miR - 143 在始基卵泡形成和调节卵泡发育和功能中起重要作用。Mase 等^[5]发现 miR - 21 在原始颗粒细胞中有着丰富的表达,进一步研究发现 COL4A1 mRNA 是 miR - 21 的作用靶点,miR - 21 参与调节 COL4A1 的合成,而 COL4A1 是颗粒细胞层基膜的重要组成部分和颗粒细胞外侧的作用嵌顿结构。

研究表明 miRNA 在排卵过程中起重要作用。研究发现,miR - 503 在卵泡生长过程中呈低表达,而在排卵前呈高表达,这表明 miRNA 可能与排卵密切相关。Kitahara 等^[6]发现 miR - 136 - 3p 通过直接结合到 LH 受体 (luteinizing hormone receptor, LHR) mRNA 参与了 LHR mRNA 的表达下调。Hasuwa 等^[7]发现 miR - 200b 和 miR - 429 在垂体中表达丰富,可以抑制 ZEB1 的表达。这两种 miRNAs 的缺失可以抑制 LH 的合成,导致无法排卵和不孕。Menon 等^[8]研究结果表明 hCG 可通过激活 cAMP/PKA/ERK 信号通路,从而增强 miR - 122 的表达,进而诱导 LHR mRNA 表达下调,最后通过 SREBPs (sterol regulatory element - binding proteins) 增加 LH 结合蛋白 (LRBP) 的表达,而 LRBP 可调节 LHR 的表达。Kugler 等^[9]发现 miR - 989 在卵巢中表达丰富,尽管突变体缺少 miR - 989 不影响卵泡的形成和成熟,但是 miR - 989 缺失严重影响卵巢边缘细胞的迁移。

miRNA 与黄体形成相关。如排卵后,LH 诱导颗粒细胞向黄体细胞转化,产生有功能的黄体的过程中,必须抑制细胞凋亡的发生,研究发现,将 miR - 21 的表达量降低至其基础表达量的 1/27 时,颗粒细胞发生凋亡,不能转化为有功能的黄体^[10]。

哺乳动物 99% 的卵泡闭锁,但其机制尚未明确。Lin 等^[11]探索了猪 miRNA 对卵泡闭锁的调节。作者构建了健康卵泡、早期闭锁卵泡、闭锁卵泡的 miRNA 表达谱,发现 miR - 26b 在卵泡闭锁过程中表达上调,miR - 26b 通过与 ATM 基因 (the ataxia telangiectasia mutated gene) 结合,从而增加 DNA 断裂和颗粒细胞凋亡。

二、miRNA 与卵巢内分泌激素的分泌表达

研究表明 miRNA 可调节卵巢细胞甾体激素的合成。miR - 18、miR - 24、miR - 32、miR - 25、miR - 132、miR - 182 的高表达可提高孕激素表达,而 miR - 378 - 3p 可抑制颗粒细胞孕激素受体表达,miR - 17 - 5p、let7b 表达低下可导致黄体功能欠佳而降低孕率^[12-14]。Sang 等^[15]研究发现卵泡液中也含有

miRNAs,其中 miR - 132、miR - 320、miR - 520c - 3p、miR - 24 和 miR - 222 均可调节雌激素的浓度,miR - 24、miR - 193b 和 miR - 483 - 5p 可调节孕激素的浓度。研究还发现多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 患者卵泡液中 miR - 132、miR - 320 的表达水平显著降低,说明其中一些 miRNA 在甾体激素的合成。相应的,卵巢激素对 miRNA 也有影响作用, Murri 等^[16]探究了 PCOS、性激素、肥胖对循环 miR - 21、miR - 27b、miR - 103、miR - 155 表达的影响,发现循环雄激素浓度可影响 miRNA,而雄激素通过增加 FSH 受体和 miR - 125b 的表达促进卵泡发育^[17]。

miRNA 影响卵巢内分泌的具体机制也有相关的研究。Dai 等^[18]对发现 Forkhead L2 (Foxl2) 在卵巢颗粒细胞中表达且参与甾体激素的合成。miR - 133b 与 Foxl2 介导的颗粒细胞雌激素释放有直接联系,miR - 133b 涉及 FSH 介导的雌激素生成过程。荧光素酶检测证实 miR - 133b 结合到 Foxl2 mRNA 的 3' UTR。MiR - 133b 的过表达可降低 Foxl2 的表达水平。此外,miR - 133b 抑制 Foxl2 结合到 StAR 和 CYP19A1 的启动序列。以上研究表明 miR - 133b 通过结合到 Foxl2 的 3'UTR,下调颗粒细胞 Foxl2 的表达,从而抑制甾体激素的合成。Xu 等^[19]研究了 miR - 378 在猪颗粒细胞中的表达,体外实验研究 miR - 378 过表达或抑制实验证实,miRNA 可降低芳香化酶和雌二醇表达,进一步研究证实了芳香化酶编码序列的 3'UTR 的 2 个 miR - 378 重要结合位点。芳香化酶 3'UTR 表达增加可以提高颗粒细胞芳香化酶在蛋白水平的表达,可能是 miR - 378 结合到了该区域,从而减少 miR - 378 结合到内源性芳香化酶 3'UTR。

三、miRNA 与 PCOS

Long 等^[20]发现 PCOS 患者 3 种血清 miRNA (miR - 222, miR - 146a 和 miR - 30c) 显著升高,其中 miR - 222 与胰岛素水平呈正相关,miR - 146a 与血清雄激素水平呈负相关。Sang 等^[15]发现卵泡液中 miR - 132、miR - 320 的表达水平显著低于非多囊卵巢综合征的妇女。Roth 等^[21]也发现卵泡液中存在 235 种 miRNAs,其中 29 种 miRNA 表达水平与正常人存在差异,5 种 miRNAs (miRNA - 32、miRNA - 34c、miRNA - 135a、miRNA - 18b 和 miRNA - 9) 显著升高,进一步研究表明这些 miRNA 与胰岛素抵抗和炎症相关。Hossain 等^[22]探索了 5 α 二氢睾酮多囊卵

巢综合征鼠模型 miRNA 的表达情况,发现 349 种 miRNA 中,其中有 24% 的 miRNA 表达发生了改变。这些改变的 miRNAs 主要定位于卵泡膜细胞,其靶基因涉及卵巢功能调节的众多通路。Chen 等^[23]发现多囊卵巢综合征患者脂肪组织中 miRNA 存在异常表达,同时证实 miR - 93、miR - 133、miR - 223 调节心肌细胞中 GLUT4 的表达,miR - 93 的表达与胰岛素抵抗指数有很大的相关性。脂肪细胞中 miR - 93 的过表达可导致 GLUT4 基因的表达下调。以上研究发现了 miR - 93 参与胰岛素抵抗调节的重要机制。

四、miRNA 与 POF

卵巢早衰 (premature ovary failure, POF) 是妇科临床常见疾病,但对于其早期诊断目前还没有较好的诊断标志物,而 miRNA 的推广可提高其诊断技术。Yang 等^[24]研究表明 POF 患者有 10 种在 miRNA 血清中显著升高,2 种显著降低。Medeiros 等^[25]发现雌性 miR - 290 - 295 - / - 鼠无法生育,其原因归结于 POF。因此,筛选出 POF 相关 miRNA 将推动 POF 的早期诊断。

研究人员对 miRNA 在卵巢中的作用机制也进行了相关研究。miR - 23a 可能通过减少 XIAP 蛋白的表达起到了调节凋亡的作用^[24]。miR - 181a 通过下调 acvr2 α 的表达从而抑制活化素诱导的颗粒细胞的增生,此机制可能涉及卵巢早衰的病理过程^[26]。

五、miRNA 与卵巢肿瘤

研究表明 miRNA 与肿瘤形成、迁移、凋亡等众多过程相关,尤其是调节卵巢细胞增生和凋亡。如 Fischer 等^[27]筛查了 CHO - SEAP 细胞株 1139 种 miRNA,发现其中 5% 的 miRNA 可促进细胞增生,13% miRNA 可通过降低细胞凋亡而降低了细胞死亡,4% miRNA 可通过降低细胞坏死而降低了细胞死亡。Guo 等研究发现在卵巢肿瘤患者中 miR - 9 的表达水平降低,进一步研究发现 NF - κ B1 mRNA 的 3'UTR 是 miR - 9 的直接作用靶点。当 miR - 9 过表达时,NF - κ B1 mRNA 和蛋白表达显著下降。miR - 9 调节 NF - κ B1 表达是抑制卵巢肿瘤增生的重要机制。Druz 等探究了中国长鼠卵巢细胞因缺乏营养引起的凋亡过程中 miRNA 表达情况。研究发现抑制 mmu - miR - 446h 导致部分抗凋亡基因的表达增加,从而增强了生存能力和 caspase - 3/7 的激活,相反,mmu - miR - 446h 的上调可抑制部分抗凋亡基因。因此,mmu - miR - 446h 在调节凋亡过程中起作用。Abdelmohsen 等报道了 miR - 519 通过降低 HuR 水平,从

而抑制肿瘤生长。miRNA 在卵巢肿瘤中起到了其他重要作用,此处不再赘述。

六、miRNA 应用前景

目前国内外研究人员对肿瘤血液疾病相关 miRNA、心血管疾病相关 miRNA、自身免疫性疾病相关 miRNA 进行了深入的研究,在技术和方法上得到了极大的突破,并且部分 miRNA 已经应用于相关疾病的诊断、预后判断。如 microRNA 可作为睾丸癌的诊断和分型、阐释病理生理改变、判断预后和治疗。研究表明血浆(血清)、唾液、尿液中的中均存在 miRNA,因此多种体液可以作为检测标本,避免了穿刺等创伤性诊断技术,在疾病的诊断中发挥重要作用,同时可应用于治疗效果及疾病预后的判别,疾病相关 miRNA 在今后医学的发展过程中极有可能成为潜在的治疗靶点。一旦卵巢相关 miRNA 及其作用靶点被发现,这些小分子潜在的临床应用就摆在了科学研究的前沿,这些研究必将带来治疗策略的改变和更好的治疗效果。

参考文献

- 1 Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004,116(2):281 - 297
- 2 Real FM, Sekido R, Lupianez DG, et al. A microRNA (mmu - miR - 124) prevents Sox9 expression in developing mouse ovarian cells [J]. Biol Reprod, 2013,89(4):78
- 3 Bannister SC, Smith CA, Roeszler KN, et al. Manipulation of estrogen synthesis alters MIR202 * expression in embryonic chicken gonads[J]. Biol Reprod, 2011,85(1):22 - 30
- 4 Zhang J, Ji X, Zhou D, et al. miR - 143 is critical for the formation of primordial follicles in mice[J]. Front Biosci;Landmark Ed, 2013, 18:588 - 597
- 5 Mase Y, Ishibashi O, Ishikawa T, et al. MiR - 21 is enriched in the RNA - induced silencing complex and targets COL4A1 in human granulosa cell lines[J]. Reprod Sci, 2012,19(10):1030 - 1040
- 6 Kitahara Y, Nakamura K, Kogure K, et al. Role of microRNA - 136 - 3p on the expression of luteinizing hormone - human chorionic gonadotropin receptor mRNA in rat ovaries[J]. Biol Reprod, 2013,89 (5):114
- 7 Hasuwa H, Ueda J, Ikawa M, et al. miR - 200b and miR - 429 function in mouse ovulation and are essential for female fertility [J]. Science, 2013,341(6141):71 - 73
- 8 Menon B, Sinden J, Franco - Romain M, et al. Regulation of LH receptor mRNA binding protein by miR - 122 in rat ovaries[J]. Endocrinology, 2013,154(12):4826 - 4834
- 9 Kugler JM, Chen YW, Weng R, et al. miR - 989 is required for border cell migration in the Drosophila ovary [J]. PLoS One, 2013,8 (7):e67075
- 10 Carletti MZ, Fiedler SD, Christenson LK. MicroRNA 21 blocks apoptosis in mouse periovulatory granulosa cells [J]. Biol Reprod, 2010,

83(2):286-295

- 11 Lin F, Li R, Pan Z X, *et al.* miR-26b promotes granulosa cell apoptosis by targeting ATM during follicular atresia in porcine ovary[J]. PLoS One, 2012,7(6):e38640
- 12 Sirotkin AV, Ovcharenko D, Grossmann R, *et al.* Identification of microRNAs controlling human ovarian cell steroidogenesis via a genome-scale screen[J]. J Cell Physiol, 2009,219(2):415-420
- 13 Toms D, Xu S, Pan B, *et al.* Progesterone receptor expression in granulosa cells is suppressed by microRNA-378-3p[J]. Mol Cell Endocrinol, 2015,399:95-102
- 14 Otsuka M, Zheng M, Hayashi M, *et al.* Impaired microRNA processing causes corpus luteum insufficiency and infertility in mice[J]. J Clin Invest, 2008,118(5):1944-1954
- 15 Sang Q, Yao Z, Wang H, *et al.* Identification of microRNAs in human follicular fluid: characterization of microRNAs that govern steroidogenesis in vitro and are associated with polycystic ovary syndrome in vivo[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2013,98(7):3068-3079
- 16 Murri M, Insenser M, Fernandez-Duran E, *et al.* Effects of polycystic ovary syndrome (PCOS), sex hormones, and obesity on circulating miRNA-21, miRNA-27b, miRNA-103, and miRNA-155 expression[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2013,98(11):E1835-E1844
- 17 Sen A, Prizant H, Light A, *et al.* Androgens regulate ovarian follicular development by increasing follicle stimulating hormone receptor and microRNA-125b expression[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014,111(8):3008-3013
- 18 Dai A, Sun H, Fang T, *et al.* MicroRNA-133b stimulates ovarian estradiol synthesis by targeting Foxl2[J]. FEBS Lett, 2013,587(15):2474-2482
- 19 Xu S, Linher-Melville K, Yang BB, *et al.* Micro-RNA378 (miR-378) regulates ovarian estradiol production by targeting aromatase

[J]. Endocrinology, 2011,152(10):3941-3951

- 20 Long W, Zhao C, Ji C, *et al.* Characterization of serum microRNAs profile of PCOS and identification of novel non-invasive biomarkers[J]. Cell Physiol Biochem, 2014,33(5):1304-1315
- 21 Roth LW, McCallie B, Alvero R, *et al.* Altered microRNA and gene expression in the follicular fluid of women with polycystic ovary syndrome[J]. J Assist Reprod Genet, 2014,31(3):355-362
- 22 Hossain MM, Cao M, Wang Q, *et al.* Altered expression of miRNAs in a dihydrotestosterone-induced rat PCOS model[J]. J Ovarian Res, 2013,6(1):36
- 23 Chen YH, Heneidi S, Lee JM, *et al.* miRNA-93 inhibits GLUT4 and is overexpressed in adipose tissue of polycystic ovary syndrome patients and women with insulin resistance[J]. Diabetes, 2013,62(7):2278-2286
- 24 Yang X, Zhou Y, Peng S, *et al.* Differentially expressed plasma microRNAs in premature ovarian failure patients and the potential regulatory function of mir-23a in granulosa cell apoptosis[J]. Reproduction, 2012,144(2):235-244
- 25 Medeiros LA, Dennis LM, Gill ME, *et al.* Mir-290-295 deficiency in mice results in partially penetrant embryonic lethality and germ cell defects[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011,108(34):14163-14168
- 26 Zhang Q, Sun H, Jiang Y, *et al.* MicroRNA-181a suppresses mouse granulosa cell proliferation by targeting activin receptor IIA[J]. PLoS One, 2013,8(3):e59667
- 27 Fischer S, Buck T, Wagner A, *et al.* A functional high-content miRNA screen identifies miR-30 family to boost recombinant protein production in CHO cells[J]. Biotechnol J, 2014,9(10):1279-1292

(收稿日期:2014-09-08)

(修回日期:2014-10-18)

(上接第8页)

- 17 Wang Y, Hu X, Greshock J, *et al.* Genomic DNA copy-number alterations of the let-7 family in human cancers[J]. PLoS One, 2012,7(9):e44399
- 18 Ye H, Chen J, Huang X, *et al.* Construction of let-7d expression vector and its inhibitory effect on HMGA2 and ras expression in human ovarian cancer cells in vitro[J]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2012,32(12):1752-1757
- 19 娄艳辉,王福玲,崔竹梅,等. 微小RNA-21与PTEN在上皮性卵巢癌组织中的表达及临床意义[J]. 现代生物医学进展, 2010,15(4):2851-2854
- 20 周星辰,邱丽华. 微小RNA-7调控EGFR抑制上皮性卵巢癌细胞上皮间质转化的研究[J]. 现代妇产科进展, 2013,22(4):264-265

- 21 Shahab SW, Matyunina LV, Hill CG, *et al.* The effects of microRNA transfections on global patterns of gene expression in ovarian cancer cells are functionally coordinated[J]. BMC Med Genomics, 2012,5:33
- 22 Fan X, Liu Y, Jiang J, Ma Z, *et al.* miR-20a promotes proliferation and invasion by targeting APP in human ovarian cancer cells[J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2012,42:318-324
- 23 Jun H, Yi J, Wei L, *et al.* Roles and mechanism of miR-199a and miR-125b in tumor angiogenesis[J]. PLoS One, 2013,8(2):e56647
- 24 双婷,吴建磊,朱彦丽. 耐药与敏感卵巢癌组织中microRNA表达差异谱检测及分析[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2013,29(1):33-35

(收稿日期:2014-11-09)

(修回日期:2014-11-13)