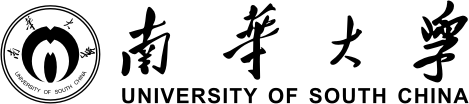
|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 分类号 |  | 密级 |  |
| U D C |  | 编号 |  |



博士学位论文

**miRNA-133b 调控卵泡发育的分子机制**

|  |  |
| --- | --- |
| 研 究 生 姓 名： | 肖国宏 |
| 指导教师姓名、职称： | 唐圣松 教授 |
| 学 科、专 业 名称： | 病理学和病理生理学 |
| 研 究 方 向： | 细胞发育调控 |

2014 年 11 月

南华大学学位论文原创性声明

本人声明，所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了论文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得南华大学或其他单位的学位或证书而使用过的材料。与我共同工作的同志对本研究所作的贡献均已在论文中作了明确的说明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

作者签名： 年 月 日

南华大学学位论文版权使用授权书

本学位论文是本人在南华大学攻读 (博/硕)士学位期间在导师指导下完成的学位论文。本论文的研究成果归南华大学所有，本论文的研究内容不得以其它单位的名义发表。本人同意南华大学有关保留、使用学位论文的规定， 即：学校有权保留学位论文，允许学位论文被查阅和借阅；学校可以公布学位论文的全部或部分内容，可以采用复印、缩印或其它手段保留学位论文；学校可根据国家或湖南省有关部门规定送交学位论文。同意学校将论文加入《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》，并按《中国优秀博硕士学位论文全文数据库出版章程》规定享受相关权益。同意授权中国科学信息技术研究所将本学位论文收录到《中国学位论文全文数据库》，并通过网络向社会公众提供信息服务。对于涉密的学位论文，解密后适用该授权。

作者签名： 导师签名：

年 月 日 年 月 日

目 录

**[Abstract](#_Toc68684081)** 13

[前](#_Toc68684082)[言](#_Toc68684082) 15

[第一部分 不同发育期人卵泡](#_Toc68684083)**[miRNA](#_Toc68684083)**[的差异表达](#_Toc68684083) 16

[第二部分](#_Toc68684084) **[miR-133b](#_Toc68684084)**[与](#_Toc68684084)**[TAGLN2](#_Toc68684084)**[的相互作用](#_Toc68684084) 18

[第三部分](#_Toc68684085) **[miR-133b](#_Toc68684085)**[靶向](#_Toc68684085)**[TAGLN2](#_Toc68684085)**[调控卵泡发育](#_Toc68684085) 26

[结论](#_Toc68684086) 38

[参考文献](#_Toc68684087) 39

[附](#_Toc68684088)[录](#_Toc68684088) 42

[参考文献：](#_Toc68684089) 45

**英文缩略语词汇表**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 缩略语 | 英文全称 | 中文全称 |
| 3'UTR | 3'untranslated region | 3'非翻译区 |
| ABP | Acting-binding protein | 肌动蛋白结合蛋白 |
| AR | Androgen receptor | 雄激素受体 |
| bHLH | Basic helix-loop-helix | 碱性螺旋－ 环－ 螺旋结  构 |
| BMI | Body Mass Index | 体重指数 |
| bp | Base pair | 碱基对 |
| cDNA | Complementary Deoxyribonucleic Acid | 互补脱氧核糖核酸 |
| CNS | Conserved noncoding sequences | 保守非编码区 |
| d | day | 天 |
| DEPC | Diethylpyrocarbonate | 焦磷酸二乙酯 |
| DMEM | Dulbecco's modified Eagle's medium | Dulbecco 改良的 Eagle  培养基 |
| DAB | 3,3'-diaminobenzidine | 3,3'-二氨基联苯胺 |
| DMSO | Dimethyl sulfoxide | 二甲基亚砜 |
| DNA | Deoxyribonucleic acid | 脱氧核糖核酸 |
| dNTP | Deoxy-ribonucleoside triphosphate | 脱氧核糖核甙三磷酸盐 |
| E2 | Estrogen hormone | 雌二醇激素 |
| EGF | Epidermal growth factor | 表皮生长因子 |
| eGFP/EGF  P | Enhanced green fluorescence protein | 增强型绿色荧光蛋白 |
| ELISA | Enzyme-linked immunosorbent assay | 酶联免疫吸附试验 |
| ER | Estrogen hormone receptor | 雌激素受体 |
| FBS | Fetal bovine serum | 胎牛血清 |
| FITC | Fluorescein isothiocyanate | 异硫氰酸荧光素 |
| FSH | Follicle stimulating hormone | 卵泡刺激素 |
| FSHR | Follicle-stimulating hormone receptor | 卵泡刺激素受体 |

1

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| GAPDH | Glyceraldehydes 3 phosphatedehydrogenase  gene | 3 '-磷酸甘油酸脱氢酶基  因 |
| GC | Granular cell | 颗粒细胞 |
| GDF | Growth differentiation factor | 生长分化因子 |
| h | Hour | 小时 |
| HCG | Human Chorionic Gonadotropin | 人绒膜促性腺激素 |
| HTF | Human tubal fluid | 人类输卵管液 |
| HYASE | Hyaluronidase | 透明质酸酶 |
| HE | hematoxylin-eosin | 苏木精-伊红 |
| HE  staining | Hematoxylin eosin staining | HE 染色 |
| HRP | Horseradish peroxidase | 辣根过氧化物酶 |
| IGF | Insulin like growth factor | 胰岛素样生长因子 |
| IGF-1 | Insulin-like growth factor | 胰岛素样生长因子 1 |
| IHC | Immunohistochemistry staining | 免疫组织化学染色 |
| IR | Insulin resistance | 胰岛素抵抗 |
| IVF | In-vitro fertilization | 体外受精（试管婴儿） |
| Kb | Kilobase pairs | 千碱基（对） |
| LH | Luteinizing Hormone | 黄体生成素 |
| LHR | Luteinizing hormone receptor | 黄体生成素受体 |
| Min | minute | 分（钟） |
| miR-133b | miR-133b | 微小 RNA-133b |
| miRNA | microRNA | 微小 RNA |
| mRNA | Messenger ribonucleic acid | 信使核糖核酸 |
| NCBI | National Center of Biology Information | （美国）国家生物信息中心 |
| OD | Optical density | 光密度 |
| P | Progestational hormone | 孕激素 |
| PMSG | Gonadotropin from pregnant mare serum | 孕马促性腺激素 |
| PAGE | Polyacrylamide gel electrophosis | 聚丙烯酰胺凝胶电泳 |

2

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| PBS | Phosphate buffered solution | 磷酸盐缓冲溶液 |
| PCO | Polycystic ovaries | 多囊卵巢 |
| PCOS | Polycystic ovary syndrome | 多囊卵巢综合征 |
| PCR | Polymerase chain reaction | 聚合酶联反应 |
| PGC | Primordial germ cells | 原始生殖细胞 |
| PMSF | PhenylmethylsulPhonylfluoride | 苯甲磺酸氟 |
| POF | Premature ovarian failure | 卵巢早衰 |
| PR | Progestrone receptor | 孕激素受体 |
| Real-time  PCR | Real time Polymerase Chain Reaction | 实时荧光定量 PCR |
| rpm | Revolutions per minute | 每分钟转数 |
| RR | Relative ratio | 相对危险度 |
| RT | Reverse transcription | 反转录 |
| RT-PCR | reverse transcription polymerase chain  reaction | 逆转录聚合酶链式反应 |
| s | second | 秒 |
| SD | Standard deviation | 标准差 |
| SDS | Sodium dodecyl sulfate | 十二烷基硫酸钠 |
| SSP | Sequence-specific primers | 序列特异性引物分析 |
| TAD | Transactivation domain | 反式激活结构域 |
| TBE | Tris-boracic EDTA | TBE 缓冲液 |
| TBS | Tris buffered saline | Tris 缓冲盐溶液 |
| TGF-β | Transforming growth factor-β | 转化生长因子-β |
| TAGLN2 | Transgelin2 | 转胶蛋白 2 |
| Tris | Tris-hydroxymethyl aminomethane | 三羟甲基氨基甲烷 |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine | N,N,N',N'-四甲基二乙胺 |
| UTR | Untranslated region | 非编码区 |
| WB | western-blot | 蛋白质印迹 |

3

**miRNA-133b调控卵泡发育的分子机制**

博士研究生肖国宏

博士生导师唐圣松 教授专业 病理学和病理生理学

**中文摘要**

国家卫生和计划生育委员会最新数据表明，2013年我国不孕症发病率7%～

10%，并有逐年上升的趋势。在不孕症的诸多病因中，广泛排卵障碍性不孕是女性不孕症常见的类型，约占25%～35%[1-3]。卵泡发育成熟障碍可引起不排卵，进而导致不孕，研究卵泡发育成熟障碍的调控机制是目前生殖领域的热点。

卵泡发育是一个极其复杂的过程，包括不同时期卵泡形态和功能的变化，受内分泌、局部因子、基因和微小RNA（miRNA）等多因素调控。对卵泡发育调控机制已经取得一些进展，但还有很多问题亟待解决。

本研究用miRNA基因芯片筛选在模拟人体卵巢内环境的条件下，不同发育时期的人卵母细胞差异表达的miRNA，选取特异性高表达miRNA作为研究靶标，用生物信息学方法分析靶标miRNA的靶基因；通过研究靶标miRNA对靶基因表达及功能的影响，探讨靶标miRNA调控卵细胞发育成熟的分子机制，寻找调控卵细胞发育成熟的药物靶点，为防治不孕不育提供提供新的实验依据。

4

**第一部分不同发育期人卵母细胞miRNA的差异表达**

**目的：**筛选在模拟人体卵巢内环境的条件下，不同发育时期的人卵母细胞差异表达的miRNA，选取特异性高表达miRNA作为研究靶标，分析靶标miRNA的靶基因。

**方法：**收集人GV期、MI期卵母细胞，用含胰岛素样生长因子-1（IGF-1）的培养液培养，以模拟人卵巢内环境，用miRNA微阵列技术筛选不同发育时期的卵母细胞差异性表达的miRNAs；用生物信息学技术预测其靶基因。

**结果：**用含IGF-1的培养液培养，GV期卵母细胞183个miRNA表达上调，

117个miRNA表达下调；MI期卵母细胞145个miRNA表达上调，200个miRNA表达下调。其中，miR-133b在MI期卵母细胞的表达上调32倍，在GV期卵母细胞miR-133b表达无差异。靶基因分析软件显示miR-133b的一个靶基因是TAGLN2；miR-133b的结合位点在*TAGLN2* 3'UTR第215-250位核苷酸。

**小结：**在模拟人体卵巢内环境的条件下，GV期卵母细胞183个miRNA表达上调，117个miRNA表达下调，MI期卵母细胞145个miRNA表达上调，200个miRNA表达下调。miR-133b是MI期卵母细胞特异性高表达的miRNA, 其靶基因可能是TAGLN2。

**关键词：**MicroRNA；卵泡发育；基因芯片

5

**第二部分miR-133b与TAGLN2基因的相互作用**

**目的：**分析miR-133b与转胶蛋白2（TAGLN2）的相互作用，确证TAGLN2

是miR-133b的靶基因。

**方法：**用基因重组技术构建TAGLN2-3'UTR及其突变表达载体（分别命名为psiCHECK-TAGLN2-3'UTR和psiCHECK-TAGLN2-3'UTR-m），用miR-133b分别与psiCHECK或psiCHECK-TAGLN2-3'UTR或psiCHECK-TAGLN2-3'UTR-m共转

染HEK 293T，用双荧光素酶报告基因检测系统分析miR-133b与TAGLN2结合情况，用免疫印迹和Realtime-PCR分析miR-133b对TAGLN2表达的影响，免疫荧光分析TAGLN2在MI期卵母细胞的表达及其在亚细胞定位。

**结果：**成功构建psiCHECK-TAGLN2-3'UTR和psiCHECK-TAGLN2-3'UTR-m

表达载体，miR-133b与psiCHECK- TAGLN2-3'UTR共转染HEK 293T细胞后，荧光素酶活性显著降低（*p*=0.00<0.01），miR-133b 与空载体psiCHECK 共转染HEK 293T 细胞后，荧光素酶活性没有明显变化（*p*=0.59> 0.05）。miR-133b 与psiCHECK- TAGLN2-3'UTR-m共转染HEK 293T细胞后，荧光素酶活性也没有明显变化（*p*=0.62> 0.05）。miR-133b与*TAGLN2* 3'UTR第215-250位核苷酸序列结合。miR-133b mimics使TAGLN2表达下调；miR-133b inhibitor可以使TAGLN2表达上调。TAGLN2定位分布人MI期卵母细胞浆，细胞核较少。

**结论：**miR-133b 是MI 卵母细胞特异性高表达miRNA，其靶基因是

TAGLN2、结合位点是TAGLN2的3’UTR第215-250位核苷酸序列。miR-133b下调TAGLN2 mRNA和蛋白的表达。TAGLN2定位于人MI期卵母细胞浆。

**关键词：**微小； RNA；卵泡发育；转胶蛋白； 2

6

**第三部分miR-133b靶向TAGLN2调控卵泡的发育成熟**

**目的：**探讨miR-133b靶向TAGLN2调控卵泡发育成熟的机制。

**方法：**首先，选择4周龄和8周龄的雌性ICR小鼠，各6只，采用免疫印记方法检测TAGLN2在4周龄和8周龄小鼠卵巢的表达水平。第二，随机选择4周龄雌性ICR小鼠，分4组，每组6只，采用免疫组化方法检测TAGLN2在窦前卵泡、窦状卵泡、排卵前卵泡及黄体中的定位和表达。第三，随机选择8周龄雌性ICR小鼠，分为3组，每组10只，用免疫荧光染色方法检测GV期、GVBD期及MII期卵母细胞中TAGLN2的表达水平。第四，随机选择8周龄雌性ICR小鼠，分成3组，每组8只，采用TAGLN2 siRNA分析沉默TAGLN2基因前后，卵母细胞直径、透明带厚度变化情况。第五，随机选择8周龄雌性ICR小鼠，随机分成5组，每组8只，通过卵巢多点注射法，将miR-133b模拟物（miR-133b

minic）、miR-133b模拟物的阴性对照（miR-133b minic negative control）、miR-133b抑制物（miR-133b inhibitor）、miR-133b抑制物的阴性对照（miR-133b inhibitor negative control）及上述制剂的溶剂注射入卵巢，分别统计每只小鼠获卵数，用免疫印迹和实时定量PCR方法检测卵巢TAGLN2的表达。第六，收集GV期卵母细胞，随机分成5组通过显微注射法将miR-133b minic、miR-133b minic negative control、miR-133b inhibitor、miR-133b inhibitor negative control及上述制剂的溶剂注射至卵母细胞胞浆，观察各组卵母细胞的成熟情况。分析miR-133b对小鼠卵母细胞成熟的影响。

7

**结果：**免疫印记显示TAGLN2在4周龄和8周龄小鼠卵巢组织均有表达，8周龄小鼠卵巢TAGLN2的表达水平显著高于4周龄小鼠卵巢（*p*=0.032<0.05），免疫组化显示TAGLN2在窦前卵泡、窦状卵泡、排卵前卵泡、黄体有表达，且定位于颗粒细胞包膜以及胞浆，细胞核几乎无表达。颗粒细胞TAGLN2的表达水平随着卵泡发育逐渐降低，排卵前卵泡达到最低（*p*=0.006<0.01*p*＜0.05），至黄体期其表达水平较排卵前卵泡增强。免疫荧光染色显示TAGLN2在小鼠卵母细胞胞浆表达，GVBD期卵母细胞TAGLN2的表达水平显著低于GV期卵母细胞的表达水平

（*p*=0.00<0.01），MⅡ期卵泡卵母细胞中TAGLN2的表达水平最低（*p=*0.02<0.05）。与对照组相比，TAGLN2-siRNA处理组卵母细胞直径显著增大（*p*=0.01<0.05），透明带厚度变化无显著差异（*p>* 0.05）。分别给小鼠卵巢及卵母细胞注射miR-133b

minic、miR-133b minic negative control、miR-133b inhibitor、miR-133b inhibitor negative control以注射上述制剂的溶剂作为对照，结果显示：与对照组比较，miR-133b mimic处理组GV期和MII期卵母细胞数增多，但无统计学意义

（*p>* 0.05），miR-133b inhibitor处理组小鼠GV期和MII期卵母细胞数显著降低

（*p*<0.05）；miR-133b mimic显著诱导卵母细胞的成熟（*p*<0.05），miR-133b

inhibitor显著抑制卵母细胞的成熟（*p*<0.05）。miR-133b mimic下调TAGLN2的表达，miR-133b inhibitor上调TAGLN2的表达。

**结论**TAGLN2定位于卵泡中颗粒细胞膜和细胞质，其表达与卵母细胞成熟呈负相关。miR-133b抑制小鼠卵巢TAGLN2 mRNA及蛋白的表达，促进小鼠卵母细胞成熟。

**关键词** 转胶蛋白； ：2；卵巢；卵细胞；卵泡发育； ICR 小鼠

8

The molecular mechanism of miR-133b regulating follicle development

**Abstract**

The data from China National Health and Family Planning Commission report that the incidence of infertility is about 7% -10% in 2013. Anovulatory infertility is a common type of female sterility in many pathogenesis of infertility. The morbidity of anovulatory infertility is up to 25% -35% in infertility and mainly results from follicular maturation disorder. The molecular mechanism of follicle maturation disorder is a hot project in the field of human reproduction.

Follicular development is an extremely complex process, including the follicular construction and function changes at various phase of ooctye, which is regulated by endocrine regulation, local factors, genes and microRNA. Though some interesting progress was found in the mechanism controling ovarian follicle development in human, there are many questions to still be involved in the field.

In this project, we plan to screen the differential expression miRNA at various phase of human ooctye under the human ovaries simulative conditions by microRNA microarray. We want to select the specific high-expression of miRNA as a research target and identify its potential binding sites to the target gene by a dual luciferase reporter assay. We will comfirm the target gene of the miRNA by immunofluorescence, Western blot and Realtime-PCR. We prefer to clarify the molecular mechanism in the development and maturation of oocyte regulated by miRNA and search for the drug target to regulate oocyte maturation and method for prevention and treatment of infertility.

9

**Part I The different expression of miRNAs at the various phase of human ooctye**

**Objective** To screen the different expression of miRNAs at various phase of human ooctye. To select the specific high-expression of miRNA targeting at some phase of human ooctye and predict the potential target of the specific high-expression of miRNA

**Methods** The oocytes at GV and MI phase were collected and pre-treated with IGF-1 to imitate the internal environment of human ovaries. The different expression of miRNAs in human ooctye at GV and MI phase was screened by microarray and speculated the targets of specific higher-expressing miRNA by bioinformatical resource.

**Result** The results from miRNA microarray indicated that **1**83 miRNAs were up-regulated and 117 miRNAs were down-regulated in GV oocytes and **1**45 miRNAs were up-regulated and 200 miRNAs were down-regulated in MI oocytes in the analogous internal environment of human ovaries. Our results showed that the expression of miR-133b was 32 fold in IGF-1 treated in MI oocytes than without IGF-1 treated oocytes. However thare was no change in miR-133b expression at GV oocytes with or without pre-treated by IGF-1. The data from bioinformatics suggested that *TAGLN2* might be a potential target of miR-133b binding at No.215 to 250 nucleotide sequences of TAGLN2 3' UTR.

**Summary** 183 miRNAs were up-regulated and 117 miRNAs were down-regulated at GV oocytes. 145 miRNAs were up-regulated and 200 miRNAs were down-regulated at MI oocytes in the analogous internal environment of human ovaries. A specific high-expression of miRNA at MI oocytes is miR-133b targeting at TAGLN2 3' UTR.

**KEy word** MicroRNA; Follicle development; gene microarray

10

**Part II Interaction between miR-133b and TAGLN2**

**Objective** To definite that TAGLN2 is a tegart of miR-133b by analyzing the interaction between TAGLN2 and miR-133b.

**Methods T**AGLN2-3'UTR and TAGLN2-3'UTR mutant expression vector was constructed by gene recombination (result in gene named as psiCHECK

-TAGLN2-3'UTR and psiCHECK-TAGLN2-3'UTR-m, respectively). miR-133b with psiCHECK or psiCHECK-TAGLN2-3'UTR or psiCHECK-TAGLN2-3'UTR-m

Repectively co-transfected into 293T cells. The binding reaction between TAGLN2 3' UTR and miR-133b was analyzed by Dual-Luciferase report gene system. The effect of miR-133b on TAGLN2 expresion was tested by Realtime-PCR and Western blot. Expression and subcellular localization of TAGLN2 were detected in MI phase

Oocytes treated with or without IGF-1 by immunofluorescence.

**Results** Both expression vectors of psiCHECK-TAGLN2-3'UTR and psiCHECK-TAGLN2-3'UTR mutant were successfully constructed. The expression of luciferase report gene was significant decreased in 293T cells cotransfected by miR-133b and psiCHECK-TAGLN2-3'UTR and was no change in 293T cells cotransfected by miR-133b and psiCHECK or psiCHECK-TAGLN2-3'UTR-m. The binding site of miR-133b to *TAGLN2* was the sequence from 215 to 250 nucleotide of TAGLN2-3'UTR. miR-133b mimic down-regulated TAGLN2 expression, but miR-133b inhibitor up-regulated TAGLN2 expression. TAGLN2 was located in the cytoplasm, but lilttle in neuleus of the oocyte at MI phase.

**Summary** The tegart gene of miR-133b is TAGLN2 locateing in the MI oocyte cytoplasm. MiR-133b binds to the sequences from 215 to 250 nucleotide of TAGLN2-3'UTR and down-regulates the expression of both TAGLN2 mRNA and protein.

**KEy word** miR-133b; Follicle development; Transgelin2

11

**Part III The mechanism of the oocyte maturation regulated by miR-133b targeting *TAGLN2***

**Objective** To investigate the regulation of miR-133b/TAGLN2 signal pathway on folicular development.

**Methods** First, The expression level of TAGLN2 in ovaries on 4 weeks oldand 8 weeks old female ICR mice was detected by Western blot. Second, we randomly divided the 4 weeks old mouse into 4 groups, each group included six mice. The expression level of TAGLN2 in preantral follicle, antral follicle, preovulatory follicle and corpus luteum were measured by immunohistochemistry. Third, we randomly divided the 8 weeks old mouse into 3 groups, each group included 10 mice. The expression level of TAGLN2 in GV, GVBD, MII oocyte were measured by immunofluorescence. Fourth, we randomly divided the 8 weeks old mouse into 3 groups, each group included 8 mice. The oocyte diameter and zona pellucida thickness were measured after injecting TAGLN2 siRNA into ovary. Fifth, we randomly divided the 8 weeks old mouse into 5 groups, each group included 8 mice. Count the number of eggs from each mouse. The expression of TAGLN2 on ovary was analyzed by Western blot and Realtime-PCR after injecting miR-133b minic, miR-133b minic negative control, miR-133b inhibitor, miR-133b inhibitor negative control and solvent control into ovary. Sixth, we divided all the GV oocyte into 5 group, observe the mature rate of oocyte after injecting miR-133b minic, miR-133b minic negative control, miR-133b inhibitor, miR-133b inhibitor negative control and solvent control into eggs by microinjection. Analyze the effect of miR-133b on oocyte maturation.

**Result** The results from western blot showed that TAGLN2 was expressed both in the ovaries of 4 or 8-week old mice and that the expression level of TAGLN2 was dramatically higher in the ovaries of 8-week old mice than those of 4-week old ones(*p*=0.032<0.05). The results from immunohistochemistry indicated that TAGLN2 was presented in preantral follicles, antral follicles, preovulatory follicles, luteal, and that TAGLN2 was mainly located in granulosa cell cytoplasm and envelope, but little in nucleus. Accompanied with the development of follicles, the expression level of TAGLN2 in granulosa cells was gradually reduced, but dramatically increased in the

12

Luteal phase (*p*=0.006<0.01). The results from immunofluorescence staining showed that TAGLN2 expressed in the mice oocyte cytoplasm and envelope. The expression level of TAGLN2 in GVBD was lower than GV oocytes (*p*=0.00<0.01) and lowest in MII oocytes (*p=*0.02<0.05). TAGLN2-siRNA significantly increased the oocyte diameter (*p*=0.01<0.05), but had no effect on the diameter of zona pellucida-free oocyte (ZP-free OD) (*p>* 0.05). MiR-133b mimic increased the number of oocyte at both GV and MI phase(*p*> 0.05) and miR-133b inhibitor significantly decreased the number of oocyte at both GV and MI phase(*p*<0.05) after ovary injected with

MiR-133b mimic、miR-133b mimic NC、miR-133b inhibitor and miR-133b inhibitor

NC. The results from ovary microinjection data suggested that miR-133b mimic induced the maturation of oocyte (*p*<0.05) and that miR-133b inhibitor lowered the maturation of oocyte (*p*<0.05). MiR-133b mimic down-regulated(*p*<0.05), but miR-133b inhibitor up-regulated TAGLN2 expression.

**Summary** TAGLN2 expression is negatively related to the oocyte maturation and located at the membrane and cytoplasm of granulosa cell. MiR-133b inhibites the TAGLN2 expression and promotes the oocyte maturation in mouse.

Postgraduate: Guohong Xiao(Major in Pathology and Pathophysiology)

Directed by professor: Shengsong Tang

**KEy word;** TAGLN2; Ovary; Oocytes; Follicular development; ICR mice

13

前 **言**

早在二十世纪50年代，Tietze（1956）利用人口统计学资料进行分析认为：

20-40岁的女性不孕症患病率为15%。资料显示：二十世纪70年代末到80年代初，美国19-49岁的女性不孕症患病率为15%，澳大利亚女性不孕症的患病率为10%-12%，芬兰30-40岁的女性不孕症的患病率为15.4%，日本的女性不孕症患病率为20%。二十世纪80年代末，世界卫生组织在25个国家的33个中心的研究结果表明：发达国家不孕症患病率为5%-8%，发展中国家一些地区高达30%。全世界的不孕症患病人数达到8000万-1.1亿。二十世纪70年代，我国不孕不育患病率为1%-2%，2013年国家卫生与计划生育委员会公布的不孕不育患病率为

7%～10%，其中广东省更高达13.3%。过去的20年，我国不孕不育患病率增加约10倍。世界卫生组织预测：未来不孕不育症将成为仅次于肿瘤和心脑血管病的第三大疾病。过往资料显示：不孕症的病因和类型很多，其中，广泛排卵障碍性不孕是女性不孕症常见的原因，约占不孕症的25%～35%[4-6]。研究表明**：**不孕的主要机理是卵泡发育成熟障碍引起排卵障碍，以致不孕。**但卵泡发育成熟障碍的调控机制尚不十分明确。**

卵泡发育是一个有序、渐进、复杂的生理过程。在卵泡发育生长过程中，卵

泡经历了静止期卵泡（始基卵泡、初级卵泡、次级卵泡）、生长卵泡期（窦前卵泡、早期窦卵泡）、成熟期卵泡（选择卵泡、成熟卵泡）三个时期共八个发育阶段，其形态和功能随着发育时相的变化而不断变化。

根据Gougeen A[7]对卵泡发育的分级，始基卵泡的直径为0.03-0.06mm，含有一个初级卵母细胞，周围包绕单层扁平的前颗粒细胞；初级卵泡直径大于

0.06mm，含有一个初级卵母细胞，周围包绕单层柱状颗粒细胞。当卵泡周围颗粒细胞由扁平变柱状，单层变复层时，卵泡发育为次级卵泡，直径达到0.12mm。次级卵泡发育成窦前卵泡后，卵泡直径为0.12mm-0.2mm，出现卵泡膜间质上皮细胞；窦前卵泡继续发育，卵泡周围颗粒细胞数目明显增多，出现透明带，并形成早期的窦腔，此期卵泡为早期窦卵泡，直径为0.3mm-0.4mm。卵泡直径继续增大，可以达到2mm以上，成为选择卵泡。选择卵泡继续发育，形成成熟卵泡。

在早期生长卵泡期，当周围细胞由扁平变柱状，单层变复层时，颗粒细胞内开始合成并分泌出粘多糖蛋白包绕卵母细胞，称为透明带，表达促卵泡生成素、

14

雌激素、孕激素、雄激素受体。颗粒细胞间及与卵母细胞间出现缝隙连接，保持细胞间营养及小分子物质交换、信息的传递。窦卵泡形成直径达到2mm后，颗粒细胞数目明显增加，对FSH的敏感性增加，依赖FSH继续发育。3-6mm的小卵泡可以产生胰岛素样生长因子，卵巢存在相应的结合蛋白及受体，颗粒细胞存在一个生长激素释放激素/生长激素/IGF-1轴，与卵泡及卵子的成熟密切相关。

从窦前卵泡发育至成熟卵泡，卵泡在结构和功能上经历募集、选择、优势化及闭锁的复杂过程。进入募集阶段的卵泡约为20-30个，它们形成卵泡簇。这些卵泡在形态上无区别。卵泡募集过程除受到FSH的作用外，还受到细胞因子，如抑制素、生长素、生长因子，经过卵泡局部旁分泌、自分泌途径调节。在进入募集阶段的窦卵泡簇中，有一个卵泡将获得定向发育，成为优势卵泡，获得排卵能力。此连续过程被称之为优势卵泡的选择。卵泡一旦离开静止期被募集后，仅有两种选择，要么成为优势卵泡，要么发生闭锁。因此，在卵泡发育的每一级时间点上均有一定比例的同级卵泡发生闭锁。当优势卵泡的直径大于14mm时，受雌激素及FSH的调节，其直径可以每24小时增加1-2mm，在双侧卵巢中占据绝对优势。在正常生理条件下，卵泡的直径大小可以作为衡量卵泡发育过程的指标之一。

在卵泡发育的不同阶段，除了卵泡形态和功能发生变化外，其精细调控过程的分子机制还涉及颗粒细胞与卵细胞间的信号传递，同时包括众多的基因/蛋白均参与其中。生理状态下，卵泡的生长发育在雌激素、雄激素、黄体生成素（LH）及卵泡刺激素（FSH）等多种激素的调控精细有序地进行。从青春期开始，原始卵泡生长启动，发育成为初级卵泡。FSH在卵泡成熟及颗粒细胞发育过程中是必需的，雌激素可促进FSH受体( FSHR) mRNA的表达。雌激素与LH和FSH协同作用，可改变颗粒细胞的基因表达及分化[8]。研究发现：卵泡期高水平LH可促使颗粒细胞过早黄素化，颗粒细胞与卵母细胞之间的联系受损，导致卵细胞减数分裂提前发生，引发信号转导异常，导致卵泡闭锁[9]。一些生长因子在卵泡发育过程中也发挥重要的调控作用。如IGF-1与颗粒细胞产生的结合蛋白(IGFBP)结合后可缓解IGF-1抑制大鼠颗粒细胞的凋亡；表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)在壁层颗粒细胞和卵丘细胞间通过旁分泌途径调控黄体生成素(luteotrophic hormone, LH)活性，在卵丘-卵母细胞复合体（cumulus-oocyte

complex, COC） 扩展（排卵的必需过程）和卵母细胞成熟过程中发挥重要作用

15

[10-11]。神经生长因子（nerve growth factor, NGF）及其受体可能通过调控卵巢内体细胞和生殖细胞的生长、分化和细胞间相互作用而影响早期卵泡的成熟和排卵。小鼠的卵泡细胞产生kit配基，可以促进初级卵母细胞的生长。初级卵母细胞的一些蛋白如编码透明带蛋白（ZP protein, ZP1-3）、生长分化因子－9（GDF-9）等，也有助于初级卵母细胞的生长。在小鼠和绵羊中，缺少GDF-9和BMP-15会使卵泡的生长和发育停滞在单层卵泡细胞阶段。在初级卵泡发育后期，卵泡细胞和膜细胞开始表达促性腺激素的受体。FSH和LH受体分别在卵泡细胞和膜细胞上表达。IGF-1能和IGFs受体相互作用，调节FSH或LH受体的表达水平，提高FSHR mRNA的稳定性，维持FSHR mRNA水平，参与FSH的抑制凋亡效应，从而扩大促性腺激素的作用，调节卵泡发育[10-13]。因此，确保卵泡发育和排卵功能正常进行的前提是调控卵巢的激素、因子和基因必须准确、及时的表达，否则将会导致卵泡发育异常、凋亡、排卵障碍等。

MicroRNA（miRNA）是一类单链的，内源性非编码的小RNA，大小一般为18-24核苷酸，通过调节靶基因的转录后水平，精细调控细胞增殖、分化、凋亡、迁移和肿瘤发生等。近年大量的研究表明：mi RNA参与了卵泡发育的调控作用

[14]. 如，Dicer I（一种mi RNA合成的关键酶）在小鼠的卵巢高表达，可调节卵泡的成熟和胚胎的发生，Dicer I酶基因突变可引起小鼠黄体功能障碍而出现不孕[15]。分析成熟小鼠卵母细胞中miR-30、miR-16、let-7和miR-17-92家族发现：let-7和miR-17-92家族是受精卵中最丰富的母系miRNA，并参与卵子生发和早期胚胎发育的动态调控[16]。这些结果提示：miRNA是靶基因转录后水平调控基因表达的重要分子，可直接或间接调控部分母源基因的表达，对卵母细胞早期减数分裂起重要的作用。Yang S等人研究了第3天及第5天新生小鼠卵巢

miRNA的表达情况，结果发现：与第3天新生鼠相比，第5天新生小鼠卵巢中有15个miRNAs表达上调，9个miRNAs表达下调。转染miR-145 antagomir后，始基卵泡的数量和比例减少，而生长卵泡的比例相对增加，其作用机制可能是miR-145 antagomir直接上调TGFBR2和激活Smad信号通路的SMAD3的表达，诱导始基卵泡的凋亡[17]。人类卵母细胞miRNA的表达谱显示，miR-100, miR-184和miR-10a特异性表达于MII期卵母细胞中，而miR-29a、miR-30d、miR-21、miR-93、miR-320a、miR-125a和let7 家族则特异性得表达于卵丘细胞，这些

miRNA参与基因转录、细胞周期、卵母细胞的发育以及抗凋亡作用等[18-19]. Kim

16

等人将不同时期的小鼠卵母细胞体外培养，并转染miRNA后观察不同时期卵母细胞的形态、成熟率、受精率，结果发现：与MI期卵母细胞的颗粒细胞相比，在MII期卵母细胞的颗粒细胞mmu-let-7b、mmu-let-7c、mmu-miR-27a和mmu-miR-322的表达下调。将差异表达的miRNAs mimic和miRNAs inhibitor转染到卵母细胞中，发现mmu-miR-27a-mimic明显降低卵母细胞的成熟率，而mmu-let-7c、mmu-miR-27a和mmu-miR-322-inhibitor则增加其成熟率，而细胞形态和受精率无明显的改变。通过靶基因分析显示，在MII期卵母细胞的颗粒细胞中IGFBP-2的表达高于MI期卵母细胞的颗粒细胞。此外，转染let-7c-mimic、miR-27a-mimic、let-7b-mimic和miR-322-mimic后，小鼠颗粒细胞中IGFBP-2的表达显著降低，而在转染这些miRNAs inhibitor后，其表达明显增高[20]。最新的研究发现，将miR-133b转染到小鼠颗粒细胞中，miR-133b协同FSH刺激雌激素的合成。miR-133b直接结合Foxl2 mRNA-3＇UTR，下调Foxl2的表达，从而抑制Foxl2介导转录的类固醇激素相关基因StAR和CYP19A1的表达，促进颗粒细胞雌激素的分泌，且具有剂量依赖性[21]，提示miR-133b可能参与了卵泡的发育过程。**miRNA可调节卵母细胞的减数分裂，影响卵母细胞的成熟**[22]**，参与卵泡的发育过程。但miRNA调控卵泡发育的分子机制尚有待于进一步探讨。**

转胶蛋白2(TAGLN2)是具有转型变异及形状改变敏感性的肌动蛋白凝胶蛋白，其编码基因定位于第11号染色体长臂，该基因含有一个最大的首要基因内区和3个短基因内区[23-25]。研究显示：TAGLN在子宫、膀胱、胃等器官平滑肌组织，以及前列腺、脊柱和卵巢等组织中表达。TAGLN2的表达能促进细胞凋亡[26]。Naïma等研究证实，来源于红尾沙鼠等三种啮齿动物（Meriones libycus、Meriones shawi、Meriones crassus）精囊的TAGLN蛋白是一种雄激素依赖性蛋白。在沙鼠发情期，这种蛋白的分泌量占分泌混合物中的可溶性蛋白的22.3%；在发情中期占到13.3%，激素分泌减退期为5.3%，在非发情期不分泌这种蛋白[27]，提示：TAGLN2蛋白可能与生物性成熟有关。同时，小鼠卵巢特异性敲除Smad4基因可导致卵泡发生异常、严重的卵丘细胞异常以及GCs过早发生黄体化，从而导致不育[28-29]。研究表明，Smad4、Smad3、Smad1与TAGLN2 启动子区域

CAGA盒结合，启动TAGLN2的表达[30]。而Smad4是TGF-β介导卵泡成熟的信号通路中的重要蛋白之一，说明TAGLN2可能参与了卵泡成熟过程。

17

本研究用miRNA基因芯片分析在模拟人卵巢内环境的条件下，卵泡差异表达的miRNA表达谱，筛选不同发育时期卵母细胞特异性高表达miRNA作为本研究靶标，用生物信息技术预测在MI期卵母细胞具高表达miR-133b的靶基因；用双荧光素酶报告基因法分析miR-133b与其靶基因TAGLN2直接结合的位点；用免疫组织化学、免疫印迹及实时定量PCR等技术分析miR-133b对其靶基因

TAGLN2的调节作用；体外实验分析miR-133b对小鼠卵母细胞形态结构、卵母细胞成熟率及其小鼠卵巢TAGLN2表达的影响。旨在阐明miR-133b调控卵泡发育的分子机制，寻找调控卵泡发育的药物靶点，为防治不孕不育症提供新的实验依据和治疗靶点。

18

# 第一部分 不同发育期人卵泡**miRNA**的差异表达

## 一、 研究背景

雌性哺乳动物生殖过程非常复杂，呈动态性的周期性变化，其中包括卵母细胞成熟、排卵、受精、卵裂、着床以及妊娠维持等。在卵泡发育过程中，卵母细胞体积不断增大并逐步发育成熟，与此同时，围绕卵母细胞周围的颗粒细胞也不断增殖和分化，以及膜细胞和外周的一些细胞不断获得具有激素分泌和激素应答的能力。卵泡发育不同阶段的形态和功能都随着发育时相的变化而不断变化。卵泡发育过程的任一环节紊乱都会干扰生殖过程，进而影响生育。尽管目前辅助生殖技术的出现在治疗不孕不育等方面取得了长足的进展，但仍有一些不孕不育病人难以通过这种技术获得后代。其中的一个主要原因在于，目前对卵泡发育调控的分子机理尚不完全明了。因此，深入了解调控卵泡发育的分子机理对于探明女性不育发生的原因和治疗等都具有十分重要的意义。

miRNA在生殖系统中的研究近年来日趋受到人们的重视。目前关于miRNA参与生殖调控的研究大多集中于正常卵巢和卵巢癌细胞中的表达分析。由于卵巢组织的独特性，它在体内反复出现内部结构形成与消失，并涉及到细胞生长、凋亡、血管形成及细胞周期等过程的复杂变化。卵巢组织本身也出现原始卵泡的激活与发育、卵泡闭锁、机体排卵及黄体形成等周期性、动态调控过程。在这一系列的过程中，任何环节出现功能障碍或失调，均可以使卵泡发生障碍，机体出现无法排卵、黄体形成障碍等一系列后果。研究显示，在卵泡发育的不同阶段中，和GV期卵泡相比，MII期卵泡中hsa-miR-193a-5p，hsa-miR-297, hsa-miR-625及hsa-miR-602表达上调，hsa-miR-888, hsa-miR-212, hsa-miR-662，hsa-miR-299-5p，hsa-miR-339-5p，hsa-miR-20a，hsa-miR-486-5p，hsa-miR-141，hsa-miR-768-5p, hsa-miR-376a及hsa-miR-15a表达下调[31-34]。

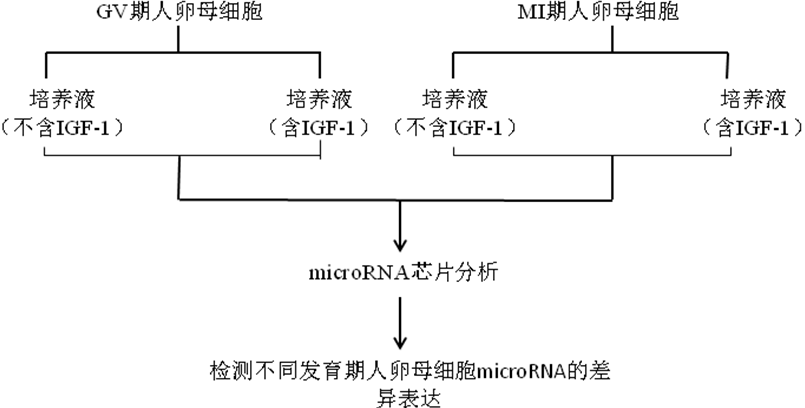
IGF-1可以由3-6mm的小卵泡自行产生，用含IGF-1的培养液培养不同发育阶段的卵泡，能较好地模拟卵泡体内发育的生理环境。miRNA的表达具有时序性和空间特异性，研究不同发育时期卵泡中miRNA的表达，针对特定的miRNA寻找其下游靶基因，研究其如何在卵泡发育、激素调控或子宫内膜接受性等方面发挥作用的，对miRNA在生殖中的深入研究，将为有效地调控生殖过程以及探明不育原因提供线索。

19

本部分用含IGF-1 的卵泡培养液培养卵母细胞，以模拟人卵巢内环境，用

miRNA芯片技术分析人GV期和MI期卵母细胞的miRNAs的表达谱，寻找具有时相特异性高表达的miRNA作为研究靶标，并用生物信息学预测其靶基因。

## 二、 技术路线



## 三、 材料与方法

**1、患者基本情况**：

收集在2013年4月~2013年6月广州医科大学附属第三医院生殖中心治疗患者的未成熟卵母细胞（GV期）、第一次减数分裂中期(MI)的卵母细胞。本研究所有实验方案均经广州医科大学附属第三医院伦理委员会审查批准，并符合

2008 年人权研究委员会“赫尔辛基宣言”伦理指南之规定。所有患者及其家属

均已知情同意。实验组GV期卵母细胞患者的平均年龄为31.61±3.97岁，而对

照的GV期卵母细胞患者的平均年龄为31.31±3.81岁，两组患者年龄间无统计学差异。实验组MI期卵母细胞患者的平均年龄为31.25 ±3.31岁，而对照的

MI期卵母细胞患者的平均年龄为31.66±3.90岁，两组患者年龄间无统计学差异。

**2、主要实验仪器**

20

高速台式离心机TGL-16B型上海安亭科学仪器厂

80-2型台式离心机上海手术器械厂

低温高速离心机himaccR21G日本日立公司电子天平 德国Sartorius公司

ZF-2型紫外光观测仪上海康华生化仪器厂纯水机 德国SG公司

电热恒温水浴箱上海医疗器械七厂

-80℃超低温保存箱THERMO公司

U-2001型紫外分光光度计日本三洋公司超净工作台SW-CJ-IF苏州安泰空气技术有限公司

自动灭菌器HvE-50型日本HIRAYAMA公司

磁力加热搅拌器：79-l型上海沪西分析仪器厂

微涡旋混合仪wH-3型上海沪西分析仪器厂

普通冰箱、-20℃冰箱新乡市新飞公司

微量移液器Eppendorf系列

CO2恒温培养箱Hrea Cell, Germany

体视显微镜日本尼康

**3、miRNA芯片分析**

将Trizol加入收集的裸卵中，按Trizol说明书提取总RNA. 采用mercury LNA™ microarray platform 检测miRNAs的表达情况。采用RNasey Mini Kit试剂盒从提取总的RNA中分离富集miRNAs, miRCURYTM Array Power Labeling kit标记，miRCURY LNA™microarray进行杂交，杂交后，对芯片进行染色和洗涤，采用Axon GenePix 4000B芯片扫描仪扫描芯片，Genepix pro

v6.0分析软件将图像信号转化为数字信号，处理分析数据。所有实验步骤均严格按照试剂盒说明书进行。为了保证结果的重复性和可靠性，每个样本用三张芯片重复进行实验，求平均值，标准化后，用t-检验分析表达差异的miRNAs，并进行无监督聚类分析和相关性分析。两组间的表达量相差大于2倍时被认为是差异表达的miRNAs(*p* <0.05)。

21

## 四、 实验结果

**1、GV期卵母细胞的miRNA微阵列芯片分析**

收集GV期卵母细胞73个，其中用含IGF-1培养液培养的GV期卵母细胞有37个，对照组（不含IGF-1培养液培养的GV期卵母细胞）36个。提取的RNA样品质检合格后进行人miRNA基因芯片分析。我们把表达差异低于或高于2倍的miRNA视为差异表达的miRNA. 结果显示：与对照组比较，含IGF-1培养液培养的GV期卵母细胞中有183个miRNA表达上调，117个miRNA表达下调（图1-1）。其中，表达高于15倍的miRNA主要有：hsa-miR-9-3p、hsa-miR-744-5p、hsa-miR-2114-5p、hsa-miR-28-5p、hsa-miR-1249、hsa-miR-892a、hsa-miR-890、hsa-miR-3926、hsa-miR-23b-3p. 其中表达低于15倍的miRNA主要有：hsa-miR-4800-5p、hsa-miR-328-3p、hsa-miR-373-3p和hsa-miR-627-5p。



**图1-1** **GV期卵母细胞差异表达miRNAs的聚类分析**

**Fig. 1-1. Screening of the differential expression of miRNA at GV phase oocyte by miRNA microarray.**

GV期人卵母细胞用用含或不含IGF-1培养液培养24h后，提取总RNA进行miRNA表达谱分析。图顶部标尺显示颜色从绿色变到红色表示变化的倍数关系。A为用含IGF-1培养液培养后GV期卵母细胞上调的miRNAs；B为用含IGF-1培养液培养后GV期卵母细胞下调的miRNA。

22

**2、MI期卵母细胞的miRNA微阵列芯片分析**

收集MI期卵母细胞96个，其中用含IGF-1培养液培养的MI期卵母细胞有

45个，对照组（不含IGF-1培养液培养的MI期卵母细胞）51个。提取的RNA样品质检合格后进行人miRNA基因芯片分析。我们把表达差异低于或高于2倍的miRNA视为差异表达的miRNA. 结果显示，与对照组比较，经含IGF-1培养液培养的MI期卵母细胞中有145个miRNAs表达上调，200个miRNAs表达下调（图1-2）。其中表达高于15倍的miRNA主要有：hsa-miR-3656、hsa-miR-139-5p、hsa-miR-4796-5p、hsa-miR-330-5p、hsa-miR-4698、hsa-miR-3124-5p、hsv2-miR-H10、hsa-miR-133b、hsa-miR-515-3p、hsa-miR-516a-5p、hsa-miR-4762-5p、hsa-miR-4508、hsa-miR-27a-5p、hsa-miR-3120-5p、hsa-miR-133a和hsa-miR-205-5p. 其中表达低于15倍的miRNA主要有：hsa-miR-411-3p、hsa-miR-19b-3p、hsa-miR-152和hsa-miR-142-5p。



**图1-2. MI期卵母细胞差异表达miRNAs的聚类分析**

**Fig.** **1-2. Screening of the differential expression of miRNA at MI phase oocyte by miRNA microarray.**

MI期人卵母细胞用用含或不含IGF-1培养液培养24h后，提取总RNA进行miRNAs表达谱分析。图顶部标尺显示颜色从绿色变到红色表示变化的倍数关系。A为用含IGF-1培养液培养的MI期卵母细胞上调的miRNAs；B为用含IGF-1培养液培养的MI期卵母细胞下调的miRNAs。

**3、miR-133b靶基因的预测**

23

用芯片技术分析MI期卵母细胞和GV期卵母细胞miRNA的表达，总共发现345个差异性表达的miRNA。其中miR-133b在MI期卵母细胞中上调最明显的miRNA（32.74倍），而在GV期卵母细胞中，miR-133b表达无差异，miR-133b可视为MI期卵母细胞特异性高表达的miRNA，因此，本实验选择miR-133b作为研究靶标。为了寻找miR-133b潜在的靶基因，用靶基因预测软件DIANA、TargetScan 4.0和PicTar对miR-133b潜在的靶基因进行预测，我们拟取3个软件同时预测到的基因作为潜在的候选靶基因。结果显示：*TAGLN2* 3'UTR的215-250核苷酸序列与miR-133b的Seed序列存在结合位点，提示：*TAGLN2*可能是miR-133b的一个靶基因（图1-3）。



**图1-3** **has-miR-133b靶基因分析**

**Fig.** **1-3. Predicting of the potential target gene of miR-133b.**

A：生物信息学预测miR-133b的靶基因；B：生物信息学预测miR-133b与TAGLN2结合的位点。

## 五、 讨论

本研究为模拟体内环境，用含IGF-1培养液分别培养GV期和MI期卵母细胞，分析了不同发育时期卵母细胞miRNA的表达情况。结果发现，与对照组比较，在含IGF-1培养液培养的GV期卵母细胞中有300个差异性表达的miRNA，其中183个miRNA表达上调，117个miRNA表达下调，在含IGF-1培养液培养的MI期人卵母细胞中有345种差异性表达的miRNA，其中145个表达上调，

24

200个表达下调。比较分析GV期卵母细胞和MI期卵母细胞差异表达的miRNA，我们发现含IGF-1培养液培养的MI期人卵母细胞的miR-133b上调32.74倍，而无论是含IGF-1培养液培养的GV期卵母细胞，还是经不含IGF-1培养液培养的GV期卵母细胞，其miR-133b的表达无明显差异，提示：miR-133b可能是MI期人卵母细胞的特异性高表达miRNA，这种miRNA是否对人卵母细胞发育具有特别意义呢？最新文献报道：miR-133b表达于小鼠颗粒细胞中，miR-133b直接结合Foxl2 mRNA-3′UTR，抑制Foxl2的表达，从而增加Foxl2介导转录的类固醇激素相关基因StAR和CYP19A1的表达，促进颗粒细胞分泌雌激素[21]。这一研究也为miR-133b参与生殖发育调控提供了间接的证据。为此，选取miR-133b作为我们下一步研究的靶标。此外，我们通过miRNA靶基因预测软件分析显示：*TAGLN2* 3'UTR的215-250核苷酸序列与miR-133b的Seed序列存在结合位点，

*TAGLN2*可能是miR-133b的一个靶基因。最近的研究证实，TAGLN2启动子区域CAGA盒与Smad4结合，可启动TAGLN2蛋白的表达。而Smad4是卵泡成熟的信号通路中的重要蛋白之一[29]。并且，在沙鼠发情期、发情中期、激素分泌减退期及非发情期，TAGLN2 蛋白分别占分泌混合物中的可溶性蛋白的

22.3%、13.3%、5.3%及0% [27]。结合文献资料和我们的研究结果，我们推测

miR-133b可能通过靶向TAGLN2基因介导的信号途径调节卵泡发育成熟过程。

## 六. 小结

1.在模拟人体卵巢内环境的条件下，GV期卵母细胞183个miRNA表达上调，117个miRNA表达下调，MI期卵卵母细胞145个miRNA表达上调，200个miRNA表达下调。

2. miR-133b 是MI 期卵母细胞特异性高表达的miRNA, 其靶基因可能是

TAGLN2.

25

# **第二部分** **miR-133b**与**TAGLN2**的相互作用

## 一、 研究背景

基因突变重组技术是研究研究目的基因与表型性状间的关系的常用的操作方法。传统的同源重组载体构建方法使用限制性内切酶和DNA连接酶通过酶切连接反应，将各片段逐步连接起来。该方法在连接过程中易引入了不必要的酶切位点碱基序列，费时费力。融合PCR（Fusion PCR）技术在不需要内切酶消化和连接酶处理，直接采用具有互补末端的引物，将不同来源的扩增片段连接起来，为同源重组片段的构建提供了快速简捷的途径。

文献报道：TAGLN可作为miRNA145靶基因，参与抑制异位子宫内膜的增生和侵袭[35]。研究发现：TAGLN2 mRNA在妊娠2-4天(D2-4)子宫上皮细胞高表达，而在假孕子宫的腺上皮只检测到低水平的TAGLN2表达，在D5-6的子宫腺上皮接近子宫肌层处低表达，胚囊处未检测到其表达，在D7发现其在子宫炎性部位低表达，主要是在子宫侧壁的有腔上皮细胞和胚囊中表达，在D8主要表达于融合区和腺上皮细胞，并在子宫系膜的滋养外胚层和有腔上皮细胞中表达增强[36]。这些研究结果提示，TAGLN2参与胚胎发育过程。但TAGLN2调控卵泡发育分子及机制尚不清楚**。**过往的研究显示**：**TAGLN参与TGF-β/SMAD信号通路，TGF-β 通过促进SMAD 与TAGLN 启动子区域的SMAD 结合结构域

（Smad-binding element, SBE）和TGF-β操纵结构域（TGF-βcontrol element, TCE）结合，激活TAGLN的表达。而TGF-β/SMAD信号通路是卵泡发育成熟的经典信号通路之一[37-39]。提示TAGLN2可能通过该通路参与卵泡发育成熟的调节。由于TAGLN2与TAGLN具有高度同源性，推测TAGLN2可能也参与了哺乳动物卵母细胞的发育。

结合文献报道及我们第一部分的实验结果，我们拟用融合PCR构建TAGLN2

3'UTR 和TAGLN2 3'UTR 突变表达载体，用双荧光素酶报告系统、实时定量

PCR、免疫荧光实验、免疫印迹实验分析miR-133b和TAGLN2的相互作用，验证TAGLN2是否是miR-133b的靶基因，为下一步研究调控卵泡发育成熟的机制提供分子靶标。

## 二、 技术路线

26

### **2.1** **miR-133b**与**TAGLN2**直接相互作用验证



### **2.2** **miR-133b**对**TAGLN2**调节作用验证



### **2.3** **TAGLN2**在卵母细胞中的定位



27

## 三、 材料与方法**1**、主要试剂的配置(1)．50×TAE配制

242g Tris, 37.2g Na2EDTA•2H2O，然后加入800ml的去离子水，充分搅拌溶解。加入57.1ml的醋酸，充分混匀。加去离子水定容至1L，室温保存。需要使用的时候，稀释为1X的。

（2）．氨苄青霉素Amp（100mg/ml）的配制

称量5g Ampicillin置于100mL烧杯中。加入40mL灭菌水充分混合溶解后定容至50mL。用0.22μm滤膜过滤除菌。1mL/份分装后-20℃保存。

（3）．2N NaOH的配制

量取80 ml去离子水置于200 ml塑料烧杯中；称取8 g NaOH小心地逐渐加入到烧杯中，边加边搅拌；待NaOH完全溶解后，用去离子水将溶液体积定容至 100 ml。将溶液转移至塑料容器中后，室温保存。（4）．LB液体培养基的配制

准确称取蛋白胨0.5g，酵母提取物0.25g，氯化钠0.5g，加水40ml；加热熔化，整个过程不断用玻棒搅拌，防止琼脂糊底而导致烧杯破裂；用1mol/L NaOH溶液调节pH至偏碱性，用蒸馏水定容到50mL。高温高压灭菌后，4℃保存。（5）。LB固体培养基的配制

液体培养基定容后，pH 7.0的LB液体培养基100 ml，加入1.5 g Agar，高温高压灭菌，冷却至60 ℃，铺制平板（约25 ml 培养基/ 90 mm 培养皿），避光保存。

(6). LB/Amp+液体培养基的配制

500 ml灭菌后LB液体培养基，冷却至60℃左右，加入500μlAmp（100 mg/ ml）溶液，摇匀，4℃保存。

(7). LB/Amp+固体培养基的配制

100 ml定容后，pH 7.0的LB液体培养基，加入1.5 g Agar，高温高压灭菌，冷却至60 ℃，加入100 μlAmp（100 mg/ ml），混匀，铺制平板（约25ml 培养基/ 90 mm 培养皿），避光保存。

28

(8).0.1% DEPC(RNase-free水):

999mL超纯水中加入1mLDEPC，磁力搅拌器混匀，37℃过夜，高压灭菌；

(9).5 XTBE Buffer缓冲液:

Tris 54 g，硼酸27.5 g，EDTA·2Na·2H 2O 3.72 g加入800 mL的去离子水充分搅拌溶解，调pH为8.3，定容至1L，室温保存，用于电泳时稀释为1 XTBE; (10). 75%乙醇:

750 mL无水乙醇中加入0.1 % DEPC水250 mL；

(11). 引物稀释:

加入适量的超纯水溶解，配制成终浓度为10 uM的溶液后备用；

(12). 1.5%琼脂糖电泳凝胶:

称取琼脂糖1.5 g加入100 mL的1XTBE电泳缓冲液中，在微波炉中充分加热溶解，冷却至60℃后加5 uL的GoldViewTM，并充分混匀。 （13）。其他相关试剂：

E. coli DH5感受态、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购于天根生化科技（北京）有限公司；限制性内切酶购自NEB 公司；高保真DNA 聚合酶购自

TaKaRa（大连）公司。转染试剂Lipofectamine2000试剂购自Invitrogen公司；psiCHECK Vector2及双荧光检测试剂盒购自Promega公司。Tris-base、乙二胺四乙酸(EDTA)、甘氨酸、丙烯酰胺、N, N-亚甲基双丙烯酰胺、DEPC处理水均购自广州展晨生物公司；Dnase、RNase inhibitor、SYBR Premix Ex TaqTM Kit及RT Master Mix (Perfect Real Time) Kit均购自罗氏生物公司；BCA蛋白定量试剂盒、ECL发光液均购自Pierce生物公司；Rabbit-anti-human TAGLN2、Rabbit-anti-humanβ-actin购自Cell Signaling Technology (CST); HRP标记的ft羊抗兔抗体购自Santa Cruz Biotechnology公司。

**2、主要实验仪器**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 仪器名称 | 厂家 | 国别 |
| 凝胶成像系统 | BIO-RAD | 美国 |
| 高速冷冻离心机, | Centrifuge5415R, Eppendorf | 德国 |
| CO2 培养箱 | Thermo | 美国 |

29

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 数显恒温水浴锅 | HH-2,江苏省荣华仪器制造有限公司 | 中国 |
| 超净工作台 | ZHJH-2109B,上海隆拓仪器设备有限公司 | 中国 |
| 多功能酶标仪 | Synergy HT,Bio-tek | 美国 |
| 台式高速大容量冷冻离心机 | Centrifuge5804R,Eppendorf | 德国 |
| 去离子水系统 | Elix,Millipore 公司 | 美国 |
| 超纯水仪 | Milli-Q,Millipore 公司 | 美国 |
| 水平电泳槽 | DYY-ZC, | 中国 |
| 涡旋混匀器 | XW-80A | 中国 |
| 微量移液器 | Eppendorf | 德国 |
| 液氮罐 | YDS-1 | 中国 |
| 核酸蛋白检测仪 | smartspecTMPluS,BIO-RAD | 美国 |
| 高压灭菌锅 | Autoclave55-32 | 日本 |
| 低温冰箱 | -20 度,SANYO | 日本 |
| 超低温冰箱 | -86 度 Thermo | 美国 |
| 常温冰箱 | 海尔 | 中国 |

**3、引物及miRNA序列**

引物序列(5'→3')：

TAGLN2-3'UTR-636-F1-XhoI: CCG**CTCGAG**CTCCCACGAATGGTTAATAT TAGLN2-3'UTR-m-R1:

**CGATCTA**CAGGGGAAAGGAAGAGGCCAG**CGATCTA**AGTTTTGATGGCTAT GGGGAAGG

TAGLN2-3'UTR-m-F2:

**TAGATCG**CTGCTGGCCTCTTCCTTTCCCCTG**TAGATCG**ATTTAGGGGCCTC AGTCCCTC

TAGLN2-3'UTR-636-R2-NotI：

AAGGAAAAAA**GCGGCCGC**TCAACAAACTCATCTTCCTCA miR-133b: UUUGGUCCCCUUCAACCAGCUA

30

MiRNA-NC: UCACAACCUCCUAGAAAGAGUAGA

**4、融合PCR**

融合PCR技术（见模式图）包括两步PCR反应：（1）应用特异性引物，对各片段进行独立扩增，特异性引物的5′末端带有一段相邻片段的互补序列；（2）在同一反应体系中加入各片段的混合物，以一对外侧引物进行融合片段的全长扩增。



融合PCR模式图

### 4.1 **TAGLN2-3**’**UTR** 基 因 的 扩 增：以引物TAGLN2-3’UTR-636-F/R 扩增

TAGLN2-3'UTR目的基因。PCR反应体系：5X PS buffer 10μl,2.5mM dNTP mix 4μl,引物10 uM 1μl(上下游各0.5μl)，模板1μl(cDNA)，Prime Star高保真酶0.25μl，H20 up to 50μl. PCR反应程序：98℃5min；98℃15s，58℃（Touchdown）15s，72℃1min,30cycle；72℃10min 。

### 4.2 **TAGLN2-3**’**UTR-m** 基因的扩增：我们将TAGLN2-3’UTR中与miR-133b相结合的序列进行无义突变，并将突变后的序列引入PCR 引物中。分别以引物

F1/R1以及F2/R2，扩增TAGLN2-3'UTR-m融合片段的上游（3'UTR-m-融合-F）及下游（3'UTR-m-融合-R）。上、下游融合片段经过胶回收纯化后按等摩尔比混匀，作为TAGLN2-3'UTR-m扩增模板，以F1/R2为引物扩增TAGLN2-3'UTR-m目的片段。扩增片断长度为636bp。

31

### 4.3 **TAGLN2-3**’**UTR 及 TAGLN2-3**’**UTR** 突变表达载体的构建：采用psiCHECK

Vector2系统，构建携带TAGLN2及TAGLN2突变基因的载体。分别将野生型和突变型的TAGLN2基因3’UTR片段克隆入表达载体psiCHECK-2中，采用菌落

PCR法与测序法鉴定。



psiCHECK-2空载体图

**5、菌落PCR鉴定**

质粒转化的第二天，观察平板上菌落的生长情况与菌落数量。挑取平板上的菌落，溶于装有50微升无菌水的无菌离心管中，振荡混匀。取0.5微升加入

PCR反应液中，作为模板进行PCR反应。PCR反应结束后，用1.5%琼脂糖进行电泳，拍照。

PCR体系：

|  |  |
| --- | --- |
| 成分 | 体积（微升） |
| 10X buffer | 2.5 |
| dNTP | 2 |
| 引物（正向） | 0.5 |
| 引物（反向） | 0.5 |
| 菌液 | 0.5 |
| rTaq 酶 | 0.25 |

32

|  |  |
| --- | --- |
| ddH2O | 18.75 |
| 总体积 | 25 |

菌落PCR反应程序：

|  |  |
| --- | --- |
| 程序 | 循环数 |
| 95℃，10min | 1 |
| 95℃,30sec |  |
| 55℃,30sec | 30 |
| 72℃,1min |  |

**6、双荧光素酶报告基因检测**

转染24小时前将HEK 293T细胞按照2.5x105cell/孔接种至24孔板。24h后细胞达到70%～80%汇合度时，将0.1μg的表达载体(psiCHECK-2空质粒、psiCHECK-TAGLN2-3'UTR和psiCHECK-TAGLN2-3'UTR-m)与microRNA进行

共转染，在HEK 293T细胞中检测microRNA对TAGLN2基因的干扰作用。

### **6.1** 实验组的设计如下：

1, psiCHECK-2空质粒；

2, psiCHECK-TAGLN2-3'UTR+miRNA-NC；

3, psiCHECK-TAGLN2-3'UTR+ miR-133b(25nM)；

4, psiCHECK-TAGLN2-3'UTR+miR-133b(50nM)；

5, psiCHECK-TAGLN2-3'UTR+miR-133b(100nM)；

6, psiCHECK-TAGLN2-3'UTR-m+ miR-133b(100nM)。

### **6.2** 脂质体转染步骤如下：

首先，在聚丙烯管里准备脂质体和DNA复合物。在聚丙烯管中加入125uL预热的Opti-MEM培养基，加入目的载体0.1µg。轻轻混匀后室温放置。在使用Lipectamine 2000之前先轻轻混匀脂质体。而后，在另一个管中加入125uL预热的Opti-MEM培养基，再加入1.25µL Lipectamine 2000。轻轻混匀后室温放置。在室温放置5min后，将上述稀释好的DNA与脂质体混合。混合物置于室

33

温孵育20min。在此期间，可以用Opti-MEM培养基清洗待转染的细胞一次。（注：由于HEK 293T细胞易脱壁，故整个过程中操作须轻缓。可以先将细胞培养板倾斜，将液体沿板壁缓慢加入，再慢慢放正细胞板。）

然后，将脂质体和DNA复合物加入细胞。上下倾斜细胞板使液体均匀覆盖在细胞表面。将细胞板放回37°C培养箱中孵育。2-4h后，移去脂质体和DNA复合物，在培养皿每个孔中重新加入500uL新鲜的培养液，将细胞放回37°C培养箱。转染36h后收获细胞进行双荧光检测目的基因在细胞中的表达情况。

### **6.3** 双荧光素酶报告基因检测**:**

细胞转染36h后弃掉培养基，并用PBS清洗一次，然后按照双荧光检测试剂盒说明书进行检测。具体如下：（a）裂解细胞：对96孔板中培养的293T细胞，吸尽细胞培养液后，每孔直接加入100 ml充分混匀的报告基因细胞裂解液，充分裂解细胞。（b）融解萤火虫荧光素酶检测试剂和海肾荧光素酶检测缓冲液，并达到室温。海肾荧光素酶检测底物(100X)置于冰浴或冰盒上备用。（c）按照每个样品需100μ1的量，取适量海肾荧光素酶检测缓冲液，按照1: 100加入海肾荧光素酶检测底物(100 X)配制成海肾荧光素酶检测工作液。（d）按照仪器说明书开启荧光检测仪，将测定间隔设为2 s，测定时间定为10 s. （e）每个样品测定时，加入100μ1萤火虫荧光素酶检测试剂，用枪打匀后测定RLU (relative light unit)。以报告基因细胞裂解液为空白对照。（f）在完成上述测定萤火虫荧光素酶步骤后，加入I00

μ1海肾荧光素酶检测工作液，用枪打匀后测定RLU.（g）在以海肾荧光素酶为内参的情况下，用萤火虫荧光素酶测定的RLU值除以海肾荧光素酶测定的RLU值。根据得到的比值来比较不同样品间目的报告基因的激活程度。

**7、Real time-PCR和Western boltting分析miR-133b对TAGLN2**

**表达的影响**

转染前一天在6孔板中每孔接种1×106个细胞，每孔细胞用2ml不含抗生素的培养基培养，在转染时细胞可长至50%-80%融合。用1×riboFECTTM CP

Buffer 和Reagent 稀释miR-133b mimic、miR-133b mimic negative control，

34

miR-133b inhibitor和miR-133b inhibitor negative control，分别将混合液加入细胞培养基中，轻轻混匀，置于37℃、5%CO2培养箱中培养48小时后，提取总RNA和蛋白质用于Realtime-PCR和Western boltting实验。

**8、免疫荧光分析**

将细胞置于盖玻片上，用冷的PBS洗涤两次；4%多聚甲醛固定30min；透膜液室温孵育20min，洗涤3次；10%BSA封闭1h；TAGLN2抗体（1:200）4℃孵育过夜，洗涤3次；FITC标记的抗体（1:100）室温孵育1h，洗涤3次；hoechst核染30min；指甲油封片；采用共聚焦激光扫描显微镜扫描和分析。

**9、RNA提取和Real-time PCR**

收集转染后的细胞，提取细胞总RNA，测定RNA的浓度和纯度，取1μg总RNA按Transcriptor First Stand cDNA Synthesis Kit试剂盒的说明书反转录合成cDNA，取5μl cDNA为模板，分别以*TAGLN2*和*GAPDH*的引物扩增，采用faststart universal SYBR green master ROX试剂盒在Real-time PCR系统中实行反应。50μl反应体系中包括25μl 1×faststart universal SYBR green master

ROX、0.5μl forward primer 0.5μl reverse primer、DEPC water和5μl cDNA，95℃10 min变性，然后95℃15s、58℃60s循环40次。所有样品均设置2个平行管，基因表达量以平行管平均循环阈值( cycle- threshold, Ct)表示。采用2-ΔΔCt 进行分析*TAGLN2*的相对表达量，实验重复3次。

10**、细胞蛋白提取**

按照总蛋白提取试剂盒说明书（上海贝博）提取细胞蛋白。在蛋白抽提前取出实验所需蛋白抽提试剂进行预冷，按照1: 99比例加入蛋白酶抑制剂混合物（例如990 μl抽提试剂中加入10 μl蛋白酶抑制剂混合物），使蛋白酶抑制剂混合物在抽提试剂中成1×工作液。每1X106的细胞加入200μl抽提工作液；冰上孵育

20分钟；10,000×g离心15~20分钟；收集上清，进行下一步分析。

35

**11、免疫印迹**

使用BCA蛋白定量试剂盒（Pierce）测定两组卵巢蛋白浓度。取40μg的蛋白进行10%的聚丙烯酰胺电泳，电泳完毕将蛋白转至PVDF膜。用5%脱脂奶粉

-TBST溶液(5g脱脂奶粉+100mlTBST溶液)室温封闭2 h，用1: 1, 000稀释比例的TAGLN2一抗（Santa Cruz）4℃孵育过夜，TBST溶液洗膜4次，每次5min；再用1: 10, 000HRP标记的二抗(Cell Signaling)室温孵育1 h, TBST溶液洗4次，每次10min。最后用高敏感化学发光试剂ECL（Biosharp）显色，在暗室内曝光胶片，显影液中显影胶片，见条带清晰后放入定影液中1-2min，取出胶片清水洗去定影液。同样方法检测β-actin作为对照，使用ImageJ软件分析条带，对条带灰度比进行计算，分析结果。

**12、统计分析**

数据统计采用mean±SD表示，各组均数间比较用t-检验或单因素方差分析，当*p*<0.05时表示差异有统计学意义。

## 四、 实验结果

**1、psiCHECK-TAGLN2-3'UTR及psiCHECK-TAGLN2-3'UTR-m**

**载体的构建**

采用融合PCR技术结合基因重组技术构建TAGLN2-3'UTR突变表达载体。从

HEK293T细胞中扩增出长度为636bp TAGLN2 3'UTR片段。以TAGLN2 3'UTR片段为模板，分别以引物F1/R1以及F2/R2，扩增TAGLN2-3'UTR-m融合片段的上游及下游片段（图2-1A）。上、下游融合片段经过胶回收纯化后按等摩尔比混匀，作为模板，以F1/R2为引物扩增，获得TAGLN2-3'UTR-m目的基因片段，扩增片断长度为636bp（图2-1B）。分别将野生型和突变型的TAGLN2基因3’

UTR片段克隆入表达载体psiCHECK-2中，转化后挑阳性菌落，以菌液为模板，进行PCR反应。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定（图2-1C）和测序鉴定（图2-1D、

E）。所有构建质粒均通过测序，证实序列的正确性。

36





**图2-1. psiCHECK-TAGLN2-3'UTR和psiCHECK-TAGLN2-3'UTR-m载体的构建.**

**Fig. 2-1. Construction of psiCHECK-TAGLN2-3'UTR and psi CHECK- TAGLN2-3'UTR-m vectors.**

A：以TAGLN2 -3'UTR片段为模板，分别扩增TAGLN2-3'UTR-m融合片段的上、下游。F1、F2为上游，

R1、R2为下游。B：1、2、3分别为上游F1、F2片段与下游R1、R2片段的融合的TAGLN2-3'UTR-m 全

37

长。C: 1-8: TAGLN2-3'UTR载体菌落PCR产物图；9-13: TAGLN2-3'UTR-m载体菌落PCR产物图。D：野生型TAGLN2-3'UTR测序结果，红框处为结合位点未突变碱基；E：突变型TAGLN2-3'UTR-m测序结果，红框处为结合位点突变后的碱基。

**2、miRNA-133b与TAGLN2直接相互作用**

将HEK 293T细胞按照2.5x105 cell/孔接种至24孔板培养至细胞达到70%～

80%汇合度时（约24h），将0.1μg 的表达载体（psiCHECK-2 空质粒、

psiCHECK-3'UTR 和psiCHECK-3'UTR-m）与miRNA133b 进行共转染，按

Promega公司的Dual-Luciferase Reporter Assay System(E1910)检测样品Luciferase活性，将海肾荧光素值（R）/荧火虫荧光素值（F）进行标准化校正后，得到相对活性。结果发现，TAGLN2和miR-133b共转染组的荧光值降低（\**p*=0.00<0.01），但是不具有浓度依赖性（图2-2）, 而其他所有的对照组的荧光值变化无统计学意义（\*\**p*=0.59> 0.05, #*p*=0.62> 0.05）。提示miR-133b与TAGLN2具有直接相互作用。



**图2-2. miRNA-133b与TAGLN2的直接相互作用.**

**Fig.** **2-2. The interaction between miR-133b and TAGLN2**

1: psiCHECK-2空质粒；2：psiCHECK-3'UTR+miRNA-NC; 3：psiCHECK-3'UTR+25nM miR-133b；

4: psiCHECK-3'UTR+50nM miR-133b; 5：psiCHECK-3U'TR+100nM miR-133b; 6:

38

PsiCHECK-3'UTR-m+100nM miR-133b

**3、miR-133b对TAGLN2 mRNA及蛋白表达的影响**

为了解miR-133b对TAGLN2 mRNA及蛋白的影响，我们将miR-133b mimic及其阴性对照miR-133b mimic-NC、miR-133b inhibitor及其阴性对照miR-133b inhibitor-NC分别转染人293T细胞。免疫印迹和实时PCR结果显示：与对照组细胞比较，miR-133b mimic显著下调TAGLN2 mRNA和蛋白的表达，miR-133b

inhibitor显著上调TAGLN2 mRNA和蛋白的表达，miR-133b mimic-NC几乎不影响293T细胞TAGLN2的表达（图2-4A, B和C，\**p*=0.036<0.05，#*p*=0.021<0.05，

\*\**p*=0.041<0.05，##*p*=0.017<0.05）。提示：miR-133b可抑制人293T细胞TAGLN2

的表达。



图2-3. miR-133b 对TAGLN2 mRNA及蛋白表达的影响。

Fig. 2-3. The effect of miR-133b on the expression of TAGLN2 mRNA and protein in 293T cells(Mean±SD, n=3)

A**：**免疫印迹分析；B.免疫印迹结果的灰度值。C：实时定量PCR分析miR-133b 对293T细胞*TAGLN2* mRNA

表达的影响。

**4. MI期人卵母细胞中TAGLN2表达**

39

为模拟卵泡体内发育的生理环境，我们在人卵母细胞培养液中加入IGF-1，

24小时后用Real-time PCR和免疫荧光技术检测人MI期卵母细胞TAGLN2的表达情况。实时定量PCR结果显示：含IGF-1的培养液培养的人MI期卵母细胞

*TAGLN2*的表达水平约为不含IGF-1的培养液培养的人MI期卵母细胞的50%（图2-4A, *p*=0.013<0.05）。免疫荧光结果显示：绿色荧光密集分布于MI期卵母细胞质，细胞核的绿色荧光强度较弱，即TAGLN2主要定位于人MI期卵母细胞质，细胞核较少。与不含IGF-1的培养液培养的人MI期卵母细胞比较，含IGF-1的培养液培养的人MI期卵母细胞绿色荧光强度显著降低，即TAGLN2的表达水平显著降低（图2-4B、C和D, *p*=0.015）。提示：TAGLN2在人MI期卵母细胞有表达，主要分布在细胞质，细胞核较少。



图2-4. MI期卵母细胞TAGLN2表达。

Fig. 2-4. The expression of TAGLN2 in MI phase oocytes(Mean±SD, n=3)

A：含IGF-1培养液培养的人MI期卵母细胞中*TAGLN2*基因在的表达情况；B：不含IGF-1培养液培养的人MI 期卵母细胞中TAGLN2 的表达情况（×100）；C：含IGF-1 培养液培养的人MI 期卵母细胞中

TAGLN2的表达情况（×100）；D: B和C的平均灰度值。TAGLN2被标记为绿色荧光，细胞核和细胞膜被标记为蓝色。

## 五、 讨论

miRNA的功能研究有多种手段与途径。利用基因敲除技术将miRNA基因敲

40

除虽然是研究miRNA功能最直接、可靠的方法，但是其费时费力，难以达到迅速筛选多条miRNA功能的目的。而miRNA海绵(miRNA sponge)虽能长时间而且有效的抑制miRNA的功能，但是由于其抑制的是细胞内多条具有相同位点的miRNA，其特异性难以得到保证，也无法应用于多条miRNA功能的快速筛选。目前最常用的通过转染或感染的方法将带有pre-miRNA序列的质粒转入细胞，或者利用转染的方法直接将人工合成的miRNA mimics或inhibitors转入细胞。在对比上述几种方法的优缺点后，我们选择了转染人工合成的miRNA mimics 或

inhibitors 这一方法，再结合双荧光素酶报告系统实验，研究了miR-133b 对

TAGLN2基因活性和表达的影响。

我们的双荧光素酶报告系统的结果显示，当miR-133b与TAGLN2-3'UTR区结合后，抑制了该基因的表达，导致载体中报告基因的结构改变，不能正常启动表达，因此荧光强度减弱，报告基因活性减低。这些结果表明：当miR-133b与*TAGLN2*基因3’UTR结合时，可抑制*TAGLN2*基因的转录。靶基因分析软件推测miR-133b与*TAGLN2*基因的结合位点位于*TAGLN2* 3' UTR 215-250位核苷酸，当我们对这两段核苷酸序列进行突变后，导致*TAGLN2* 3' UTR的miR-133b结合位点改变时，此时，miR-133b不能与*TAGLN2* 3' UTR结合，其对*TAGLN2*基因转录抑制同时解除。这些结果表明*TAGLN2* 基因是miR-133b的靶基因。

我们在卵母细胞培养液中加入IGF-1以模拟卵泡发育的生理环境。在mRNA

水平，我们首先通过实时定量PCR技术，证实了在含IFG-1的培养液中培养的

MI期卵母细胞中*TAGLN2*的表达量仅仅是对照组（不含IFG-1的培养液中培养的卵母细胞）中的50%。随之，我们提取293T细胞的总RNA，采用实时定量PCR技术，分析miR-133b对*TAGLN2*基因的调控作用。转染miR-133b mimic的293T细胞中的*TAGLN2*表达水平均低于对照组，而转染miR-133b inhibitor的293T细胞中的*TAGLN2*则升高。在蛋白水平，我们首先通过免疫荧光技术证实了在含IFG-1的培养液中培养的MI期卵母细胞中TAGLN2的表达量明显低于对照组（不含IFG-1的培养液中培养的卵母细胞）中的TAGLN2的表达。随之，我们将人工合成的miRNA mimic或inhibitor转染入293T细胞内，提取细胞总蛋白，然后用针对靶蛋白TAGLN2的特异性抗体，采用免疫印迹的方法，分析miR-133b 对

TAGLN2的调节作用。我们发现转染miR-133b mimic的293T细胞中的TAGLN2

41

表达水平均低于对照组，而转染miR-133b inhibitor的293T细胞中的TAGLN2则升高。这些结果表明：1）TAGLN2在卵泡发育的生理环境中，主要分布在细胞质，细胞核较少。2）miR-133b在转录后水平降低TAGLN2的表达。

## 六、 小结

1. miR-133b 的靶基因是TAGLN2，其结合位点是TAGLN2 3'UTR 第215-250

位核苷酸序列。

2. miR-133b下调TAGLN2 mRNA和蛋白的表达，TAGLN2定位于人MI期卵母细胞质。

42

# **第三部分** **miR-133b**靶向**TAGLN2**调控卵泡发育

## 一、 研究背景

微小RNA133b（miR-133b）位于染色体6q12.2，能在多种组织中检测到，具有广泛的组织表达性[40-41]。以往的研究表明，miR-133b靶向不同的蛋白将产生不同的生理功能。例如，靶向抗凋亡蛋白-Fas凋亡抑制因子(FAIM)，产生抗前列腺肿瘤的作用[42]；靶向RhoA，影响脊髓再生[43]；靶向FGFR1，抑制胃癌细胞的生长[44]；激活ERK及AKT1信号通路，促进宫颈癌的发生[45]；靶向MyoD，促进骨格肌发育[46]。靶向*pitx3*，参与调控多巴胺能神经元的分化、成熟[47]。靶向caspase 9，产生抗凋亡作用[48]。最新的研究发现，将miR-133b转染到小鼠颗粒细胞中，miR-133b协同FSH刺激雌激素的合成，且miR-133b直接结合Foxl2 mRNA-3＇UTR，下调Foxl2的表达，从而抑制Foxl2介导转录的类固醇激素相关基因StAR和CYP19A1的表达，促进颗粒细胞雌激素的分泌，且具有剂量依赖性[21]。该研究揭示miR-133b可能参与了卵泡的发育过程。

转胶蛋白(TAGLN)是具有转型变异及形状改变敏感性的肌动蛋白凝胶蛋白，其编码基因定位于第11号染色体长臂，该基因含有一个最大的首要基因内区和3个短基因内区[23、49、50]。已有研究显示TAGLN2可能是卵泡成熟、排卵和闭锁过程中一个重要的转录标记分子[51-52]。

我们第一部分和第二部分的实验已经证实，*TAGLN2*基因是miR-133b的靶基因，miR-133b与*TAGLN2*基因的结合位点位于*TAGLN2* 3' UTR 215-250位核苷酸。miR-133b可以调节TAGLN2 mRNA及蛋白的表达水平。本部分用卵母细胞显微注射、卵巢多点注射、RNA干扰、免疫印迹、免疫荧光技术及实时定量PCR等技术分析，在干预TAGLN2表达的条件下，卵泡发育成熟的变化情况。旨在阐明miR-133b靶向干预TAGLN2表达，调控卵泡发育成熟的机制。

## 二、 技术路线

### **2.1** **TAGLN2**在小鼠卵巢和不同发育期卵母细胞中的表达

43



### **2.2** **TAGLN2**对小鼠排卵和卵母细胞形态的影响



### **2.3** 体内验证**miR-133b**对**TAGLN2**的调节作用



44

### **2.4** 体外验证**miR-133b**对**TAGLN2**的调节作用



## 三、 材料与方法

**1.实验动物**

3-4周龄和7-8周龄SPF级ICR雌性小鼠，体重在15-20g和25-35g。该小鼠购自广东省医学实验动物中心，饲养于广州医科大学实验动物中心，自由进水和采食，室内温度控制在20℃-26℃，相对湿度50%-70%，光照明暗交替12h/12h。所有实验动物的操作及饲养均符合国家标准，遵循人道主义原则。动物许可证号：

SCXK(粤) 2013-0002.

**2.小鼠卵巢标本的采集**

1）.选择4周龄和8周龄的雌性ICR小鼠，颈椎脱臼法处死小鼠，取出卵巢，提取卵巢总蛋白，用免疫印迹方法检测TAGLN2在不同周龄小鼠卵巢的表达水平。具体分组如下：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 组别 | 动物数（只） | 观察指标 |
| 4 周龄组 | 6 |  |
|  |  | 小鼠卵巢 TAGLN2 蛋白表达 |
| 8 周龄组 | 6 |  |

45

2）.随机选择4周龄小鼠，分4组，每组6只，其中第1组不做任何处理，收集小鼠卵巢，观察窦前卵泡TAGLN2的表达；第2组在注射PMSG（5U/只）

48h后收集小鼠卵巢，观察窦状卵泡TAGLN2的表达；第3组在注射PMSG(5U/只) 48h后，再腹腔注射HCG(5U/只) 9h后处死小鼠，收集卵巢，观察排卵前卵泡TAGLN2的表达；第4组在注射PMSG(5U/只) 48h后，再腹腔注射HCG

（5U/只）24h后处死小鼠，收集卵巢，观察黄体TAGLN2的表达。具体分组如下：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 组别 | 动物数（只） | 观察指标 |
| 未处理组 | 6 | 窦前卵泡 TAGLN2 的表达情况 |
| PMSG(48h) | 6 | 窦状卵泡 TAGLN2 的表达情况 |
| PMSG(48h)+HCG(9h) | 6 | 排卵前卵泡 TAGLN2 的表达情况 |
| PMSG(48h)+HCG(24h) | 6 | 黄体 TAGLN2 的表达情况 |

**3.小鼠卵母细胞的收集**

随机选择8周龄雌性ICR小鼠，分为3组，每组10只。

第1组腹腔注射PMSG(10U/只)，48小时后颈椎脱臼法处死小鼠，迅速分离卵巢置于预热的PBS（PH 7.4）溶液中，去卵巢周围脂肪组织和输卵管，用细针刺破卵巢有腔大卵泡，在37℃恒温解剖显微镜下收集GV期卵母细胞备用。

第2组腹腔注射PMSG(10U/只)，48h后再腹腔注射注射HCG（10U/只），

5h后取卵巢置于预热的PBS溶液中，收集GVBD卵丘细胞复合体，洗涤备用。第3组腹腔注射PMSG(10U/只)，48h后再腹腔注射注射HCG（10U/只），

12h后取输卵管置于预热的PBS溶液中，收集MII期卵丘细胞复合体，洗涤备用。MII期卵母细胞置于0.1%的透明质酸酶的PBS液中，室温放置10min，以去除颗粒细胞，备用。

具体分组如下：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 组别 | 动物数（只） | 不同发育时期的卵母细胞 |
| PMSG(48h) | 10 | GV 期卵母细胞 |
| PMSG(48h)+HCG(5h) | 10 | GVBD 卵丘细胞复合体 |
| PMSG(48h)+HCG(12h) | 10 | MII 期卵丘细胞复合体 |

46

**4、主要试剂**

TAGLN2引物由上海生工合成，TAGLN2-siRNA由广州锐博生物公司合成。

TAGLN2引物序列如下（5'-3'）：

Forward primer: TGAGAACACTCCCTGTCCCA; Reverse primer: CGGGGAGCTCACCAAAGC；

GAPDH引物序列如下（5'-3'）

Forward primer: AATGGGCAGCCGTTAGGAAA; Reverse primer: GCCCAATACGACCAAATCAGAG; TAGLN2-siRNA：

靶序列：CCGAGCGCTATGGCATTAA；

正义链(5'-3'): 5‘CCGAGCGCUAUGGCAUUAA dTdT 3'**;**

反义链(3'-5'): 3‘dTdT GGCUCGCGAUACCGUAAUU 5‘

其余试剂见第二部分。

**5.组织蛋白提取**

按照总蛋白提取试剂盒说明书（贝博）提取组织蛋白。取冻存于-80℃的4周龄和8周龄小鼠卵巢组织各100g，剪碎后加入组织裂解液500μl，用组织匀浆器匀浆至无明显肉眼可见固体，将全部的组织匀浆分别加入两只预冷的干净离心管中，在4℃，12000g离心30分钟，将上清分别加入另两只预冷的干燥离心管，即得到总蛋白。

**6.免疫印迹**

详见第二部分

**7.免疫组织化学染色**

将置于4%多聚甲醛溶液中的小鼠卵巢石蜡包埋，连续切片，每张片厚5μm。依次脱蜡至水，EDTA抗原修复缓冲液（PH8.0）进行抗原修复，3%H2O2阻断内源性过氧化物酶，一抗（兔抗小鼠TAGLN2 抗体）孵育，稀释度1: 200，4℃冰

47

箱过夜，二抗（HRP-ft羊抗兔抗体）室温孵育1h，稀释度1: 200，然后进行DAB显色，染核，脱水，封片。阴性对照用PBS溶液代替一抗孵育。各级卵泡按照文献[7]制定的卵泡发育阶段标准进行分级。

**8.免疫荧光染色**

详见第二部分

**9、实时定量PCR**

详见第二部分

**10、TAGLN2 siRNA体内直接注射**

注射方法：1）腹腔注射：选择8周龄的ICR小鼠，5nmol/次，连续注射3天，最后一次注射后24h，取卵巢提RNA, qPCR方法检测TAGLN2 mRNA表达量；2）尾静脉注射：选择8周龄的ICR小鼠，5nmol/次，连续注射3天，最后一次注射后24h，取卵巢提RNA, qPCR方法检测TAGLN2 mRNA表达量。具体分组如下：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 组别 | 动物数（只） | 观察指标 |
| TAGLN2 siRNA 腹腔注射组 | 6 |  |
| TAGLN2 siRNA 尾静脉注射组 | 6 | TAGLN2 mRNA 表达情况 |

随机选择8周龄小鼠，分成3组，每组8只，对照组不做任何处理，第1组尾静脉注射TGALN2-siRNA，连续注射3天，每次5nmol，第2组尾静脉注射制剂溶剂（DEPC水），连续注射3天，每次250ul。各组在最后一次注射24h后，腹腔注射PMSG（10U/只）促排卵，48h后注射HCG(10U/只)，12h后处死小鼠，获取输卵管，收集各组小鼠MII期卵母细胞。统计各组卵母细胞直径、透明带厚度。具体分组如下：

48

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 组别 | 动物数（只） | 观察指标 |
| 未处理组 | 8 |  |
| TGALN2-siRNA 组 | 8 | 统计各组卵母细胞直径、透明带厚度。 |
| DEPC 水组 | 8 |  |

**11. 卵母细胞显微注射**

将预热的G-MOPS液滴入注射皿，每滴约15-20ul，然后盖上预热的矿物油，至少提前2h预热。将脱去卵丘-卵母细胞复合体的GV期卵母细胞放入G-MOPS滴，每个滴约8-10个卵母细胞。实验分为5组。在显微操作仪下固定好卵母细胞后，将miR-133b mimic、miR-133b mimic negative control、miR-133b

inhibitor、miR-133b inhibitor negative control以及上述制剂的溶剂分别注射入

GV期卵母细胞胞浆，每个卵母细胞注射约5-9pl。注射后将卵母细胞放入IVM培养液（SAGE, USA），观察并记录各组卵母细胞发育成熟情况。每组注射的卵母细胞数均在200个以上，每组卵母细胞的显微注射均在30min内完成。



**卵母细胞显微注射示意图**

具体分组如下：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 组别 | 卵母细胞数（个） | 观察指标 |
| miR-133b mimic 组 | >200 |  |
| MiR-133b mimic negative control 组 | >200 |  |
| MiR-133b inhibitor 组 | >200 | 各组 8h, 16h 卵母细  胞成熟率 |
| MiR-133b inhibitor negative control 组 | >200 |  |
| 上述制剂的溶剂组 | >200 |  |

49

**12.卵巢多点注射miR-133b**

12.1实验分组：选择8周龄雌性ICR小鼠，随机分成5组，每组8只，依次为对照组、miR-133b minic组、miR-133b minic negative control组、miR-133b inhibitor组和miR-133b inhibitor negative control组。

12.2卵巢多点注射：用5%水合氯醛麻醉小鼠，以0.01ml/g小鼠腹腔注射，待小鼠全身肌肉松弛，呼吸均匀，针刺脚掌无反应时，表明进入麻醉状态，备皮；在ICR小鼠背部两侧做一约0.5cm的切口，逐层分离，暴露两侧卵巢；用眼科弯镊小心钳夹卵巢周围的脂肪垫，固定卵巢位置，用内径为100μm的10μl微量进样器将各组对应的miRNAs注射入卵巢，每侧5μl，尽量避开血管和卵巢门进行多点注射；将卵巢放回腹腔，局部涂抹抗生素，逐层缝合肌肉和皮肤（图3-1）。

12.3小鼠卵巢及卵母细胞的收集和TAGLN2的检测：注射miRNA溶液96h后，腹腔注射PMSG（10U/只）促排卵，48h后腹腔注射HCG(10U/只)，12-16h后颈椎法处死小鼠，剪开腹腔，收集双侧输卵管和卵巢，备用。具体操作如下：

①剪开腹腔，分离卵巢和输卵管，分为2组。第1组卵巢收集后置于-80℃冰箱保存备用。提取总蛋白和RNA，用于Western blot和Real-time PCR检测。第2组卵巢和输卵管置于预热的G-MOPS液中，用于后面实验。

②在显微镜下用尖镊刺破输卵管壶腹部，轻轻挤压破口两侧输卵管，使卵丘-卵母细胞复合体排出，将卵丘-卵母细胞复合体置于配制好的含有透明质酸酶的G-MOPS液中5-10min，轻轻吹打，使卵母细胞周围的颗粒细胞，卵丘细胞充分溶解，记录排出极体的卵母细胞数，几乎均为成熟卵母细胞（MII期）。

③用刀片将卵巢切碎，使卵丘-卵母细胞复合体充分排入G-MOPS液中，收集卵母细胞，记录未成熟卵母细胞数，几乎均为未成熟卵母细胞（GV期）。

具体分组如下：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 组别 | 动物数（只） | 观察指标 |
| miR-133b mimic 组 | 8 |  |
| MiR-133b mimic negative control 组 | 8 | 1: 各组获卵数，成熟  和未成熟卵母细胞数；  2: 卵巢 TAGLN2mRNA  及蛋白表达情况 |
| MiR-133b inhibitor 组 | 8 |
| MiR-133b inhibitor negative control 组 | 8 |
| 上述制剂的溶剂组 | 8 |  |

50



图3-1 小鼠卵巢多点注射部位示意图

Fig. 3-1. Inject site of mouse ovary.



图3-2 各期小鼠卵母细胞形态图

Fig. 3-2. Morphology of mouse oocyte

**13.统计学处理**

运用SPSS 17.0软件进行统计学分析，计量资料用均数±标准差表示，采用单因素方差分析，t检验，率的比较采用卡方检验。*p*<0.05表明差异具有统计学意义。所有实验均重复3次以上。

## 四、 实验结果

**1．TAGLN2蛋白在卵巢中的表达定位及其与卵泡发育的关系**

取不同周龄的小鼠卵巢，提取卵巢的总蛋白质，用Western blot分析

TAGLN2在卵巢的表达情况，并进行灰度分析，结果显示：8周龄小鼠卵巢和 4

51

周龄小鼠卵巢均有表达（图3-3A），其中8周龄小鼠卵巢TAGLN2的表达显著高于4周龄小鼠卵巢（图3-3B, *p*=0.032<0.05）。取卵巢组织，切片后，进行免疫组化分析，结果显示：TAGLN2在窦前卵泡、窦状卵泡、排卵前卵泡、黄体、卵母细胞胞质、卵泡外膜细胞均有表达，其中，排卵前卵泡的颗粒细胞TAGLN2的表达水平显著低于窦前卵泡、窦状卵泡、黄体的颗粒细胞（图3-4 A-E, *p*=0.006<0.01, 表3.1），提示：颗粒细胞TAGLN2的表达水平随着卵泡发育逐渐降低，排卵前卵泡达到最低。TAGLN2定位分布在各级卵泡周围颗粒细胞包膜和胞质，细胞核未见表达（图3-4 A-F）。



图3 -3.不同年龄小鼠卵巢TAGLN2的表达。

Fig. 3-3. The expression of TAGLN2 at various ag ein mouse ovary(Mean±SD, n=3)



52



图3-4. TAGLN2在卵泡的表达。

Fig. 3-4 The expression of TAGLN2 at the follicle(Mean±SD, n=3).

A-E: 免疫组化分析不同发育期卵泡TAGLN2表达；F：相对灰度值

表3.1 卵泡发育不同阶段颗粒细胞TAGLN2的表达

Table 3.1. The expression of TAGLN2 in granular cell at various phase in follicle

|  | n | 颗粒细胞平均光密度值 | F | P |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 窦前卵泡 | 25 | 0.214±0.013 |  |  |
| 窦状卵泡 | 30 | 0.223±0.006 | 5.438 | 0.006 |
| 排卵前卵泡 | 18 | 0.155±0.005\* |  |  |
| 黄体 | 16 | 0.210±0.006 |  |  |

\*与其他3组相比，*p*=0.006<0.01

**2．不同成熟阶段小鼠卵母细胞TAGLN2蛋白表达及其与卵母细胞成熟的关系**

收集生殖泡破裂期（GVBD）卵母细胞、生殖泡期（GV）卵母细胞和MII期卵母细胞，免疫荧光染色，结果显示：小鼠卵母细胞胞浆被染绿色荧光，卵母细胞核无荧光；GVBD期卵母细胞TAGLN2的表达水平明显低于GV期卵母细胞的表达水平（*p*=0.00<0.01），与GVBD 期卵母细胞相比，MII 期卵母细胞

TAGLN2的表达水平更低，差别有统计学意义（*p=*0.02<0.05）（图3-5, 表3.2）。

53





图3-5. 不同成熟时期卵母细胞TAGLN2的表达（×200）

Fig. 3-5. Expression of TAGLN2 at various developing phase in the mouse oocyte(Mean±SD，n=3，**×**200)

表3.2 小鼠不同成熟时期卵母细胞TAGLN2的表达情况

Table 3.2. Expression of TAGLN2 at various developing phase in the mouse oocyte

| Oocytes stage | n | Mean density of fluorescence | F | p |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| GVBD  GV | 67  82 | 0.057±0.005\*\*  0.109±0.014 | 24.648 | 0.000 |
| MII | 71 | 0.022±0.002\* |  |  |

\*\* *p*=0.00<0.01, compared with GV phase arrestted oocyte. **\****p=*0.02<0.05, compared with GVBD stage oocyte.

**3. TAGLN2对小鼠卵泡发育的影响**

**3.1 TAGLN2 siRNA的最佳干扰效果的确定**

为了确定TAGLN2 siRNA的最佳干扰效果，分别用腹腔注射法（Ip-siRNA）和尾静脉注射法（Cv-siRNA）分析TAGLN2-siRNA对*TAGLN2*的干扰效果。结果

54

显示，采用尾静脉注射法，注射TAGLN2-siRNA后，TAGLN2的表达降低为正常对照组的22%；而采用腹腔注射法，注射TAGLN2-siRNA后，TAGLN2的表达降低为正常对照组的44%（图3-6）。在后续实验中，我们将采用尾静脉注射法分析

*TAGLN2*对小鼠排卵的影响。



图3-6 腹腔注射和尾静脉注射法分析TAGLN2-siRNA对*TAGLN2*的干扰效果

Fig. 3-6. The effect of TAGLN2-siRNA on*TAGLN2* silencing by Ip-siRNA and

Cv-siRNA

**3.2 TAGLN2基因沉默对卵泡形态发育的影响**

采用合成的TAGLN2 siRNA沉默*TGLN2*基因，分析卵泡发育各指标变化情况，包括卵母细胞直径、透明带厚度。结果显示：卵母细胞直径增大

（*p*=0.01<0.05）。透明带厚度变化无差异（表3.3）。提示：TAGLN2 siRNA可促进卵母细胞成熟。

表3.3 TAGLN2-siRNA对卵泡形态发育的影响

Table 3.3 The effect of TAGLN2-siRNA on follicular morphology

| 检测指标（μm） | 空白对照组 | DEPC组 | TAGLN2-siRNA组 |
| --- | --- | --- | --- |
| 卵母细胞直径 | 97.38±3.06 | 98.51±4.39 | 102.03±1.84\* |
| 透明带厚度 | 7.81±0.65 | 7.72±0.62 | 7.35±0.68 |

与其他组相比\**p*=0.01<0.05

**4、体内实验miR-133b对小鼠卵泡发育的影响**

分别给小鼠卵巢注射miR-133b mimic、miR-133b mimic NC、miR-133b

inhibitor和miR-133b inhibitor NC、以注射上述制剂的溶剂作为对照，结果显示：

GV期的卵母细胞数分别为32.25±2.6 0、26.38±2.60、21.50±1.44和25.13±2.81，对

55

照组为29.00±3.90（表3.4）；MII期卵母细胞数分别为19.38±1.93、15.88±1.16 、

12.75±0.84和16.00±2.18，对照组为16.00±1.31（表3.4）。与对照组比较，miR-133b

mimic处理组GV期及MII期卵母细胞增多，但均无统计学意义（*p>* 0.05）。miR-133b

inhibitor处理组GV期及MII期卵母细胞数显著降低（*p*<0.05）。

表3.4 miR-133b对小鼠卵母细胞数的影响

Table 3.4 The effect of miR-133b on oocyte number（Mean±SD）

|  | 对照组 | MiR-133b mimic | MiR-133b mimic NC | MiR-133b inhibitor | MiR-133b inhibitor NC |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| MII | 16.00±1.31 | 19.38±1.93 | 15.88±1.16 | 12.75±0.84 \* | 16.00±2.18 |
| GV | 29.00±3.90 | 32.25±2.68 | 26.38±2.60 | 21.50±1.44 \*\* | 25.13±2.81 |

\**p*=0.01<0.05. **\*\****p*=0.005<0.05**.**

**5、体外实验miR-133b对小鼠卵母细胞成熟的影响**

小鼠GV期卵母细胞随机分为5组，分别显微注射miR-133b mimic、miR-133b mimic NC、miR-133b inhibitor和miR-133b inhibitor NC、以注射上述制剂的溶剂作为对照，结果显示：GVBD期卵母细胞率分别为69.3%、55.8%、52.0%和56.9%，对照组为61.6%（表3.5），MII期卵母细胞率分别为66.7%，53.8%、48.0%和54.9%，对照组为58.5%（表3.5）。与对照组比较，miR-133b mimic组的GVBD期卵母细胞率和MII期卵母细胞率有增加趋势，miR-133b inhibitor组GVBD期卵母细胞率和

MII期卵母细胞率有减少趋势，但均无统计学意义（*p>* 0.05）；与miR-133b inhibitor组比较，miR-133b mimic组的GVBD期卵母细胞率（\**p*=0.024<0.05）和MII期卵母细胞率（\*\**p*=0.017<0.05）存在显著差异，提示miR-133b mimic可诱导卵母细胞的成熟，而miR-133b inhibitor可抑制卵母细胞的成熟。

表 3.5 miR-133b对小鼠卵母细胞成熟率的影响

Table 3.5 ．The effect of miR-133b on maturation rate of oocyte

| Treatment | Total | 8H No. of oocytes (%)  Germinal vesicle breakdown | 16H No. of oocytes (%)  Metaphase II |
| --- | --- | --- | --- |
| Control | 159 | 98(61.6%) | 93(58.5%) |
| Minic | 75 | 52(69.3%)\* | 50(66.7%)\*\* |
| Minic negative control | 52 | 29(55.8%) | 28(53.8%) |

56

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Inhibitor | 50 | 26(52.0%) | 24(48.0%) |
| Inhibitor negative control | 51 | 29(56.9%) | 28(54.9%) |

**6. miR-133b对小鼠卵巢TAGLN2表达的影响**

为了解miR-133b对小鼠卵巢TAGLN2表达的影响，将miR-133b mimic、miR-133b mimicNC、miR-133b inhibitor和miR-133b inhibitorNC直接注射入小鼠卵巢内，分别用实时定量PCR和免疫印迹检测小鼠卵巢TAGLN2表达情况。结果显示：miR-133b mimic抑制TAGLN2 mRNA（\**p*=0.005<0.05）和蛋白

（**\*\****p*=0.03<0.05）的表达（图3-8）；miR-133b inhibitor诱导TAGLN2 mRNA

（#*p*=0.008<0.05）和蛋白（#*#p*=0.01<0.05）的表达（图3-8）。



图3-8. miR-133b对小鼠卵巢TAGLN2 mRNA和蛋白表达的影响。

Fig.3-8. The effect of miR-133b on the expression of TAGLN2 mRNA and potein in ICR mouse ovary (Mean±SD, n=3) .

## 五、 讨论

对小鼠卵巢进行免疫组化染色发现，TAGLN2 蛋白在小鼠卵巢中表达，

TAGLN2在窦前卵泡、窦状卵泡、排卵前卵泡、黄体均有表达，其主要定位在各级卵泡的颗粒细胞包膜和胞浆。颗粒细胞TAGLN2的表达水平随着卵泡发育逐渐降低，排卵前卵泡达到最低，至黄体期其表达水平较排卵前卵泡增强。

对不同成熟阶段的卵母细胞进行免疫荧光染色发现：TAGLN2主要在小鼠卵母细胞浆表达，卵母细胞核几乎无表达。随着卵泡的发育成熟，TAGLN2的表达

57

水平逐渐下降，这些结果提示：TAGLN2是卵泡发育的负性调节因子。

用卵巢多点注射法分析miR-133b对卵巢TAGLN2表达的影响，结果提示：miR-133b可抑制小鼠卵巢TAGLN2 mRNA和蛋白的表达。用卵巢多点注射法分析miR-133b对小鼠卵泡发育成熟的影响，结果显示：miR-133b mimic可诱导

GV期和MII期卵母细胞增多，但无统计学意义（*p*> 0.05）。分析出现这样结果的原因可能涉及：我们用于动物实验的miRNA均为化学合成，与天然miRNA在稳定性方面存在一定差异。当直接将化学合成的miRNA 注射至动物体内后，

miRNA在体内吸收、分布、代谢、排泄等途径较为复杂。

在对发育过程基因表达的研究中，卵母细胞的显微注射是一种非常普遍的方法。本研究中，我们用卵母细胞显微注射法分析miR-133b对小鼠卵母细胞成熟的影响，结果提示：与对照组比较，miR-133b mimic组的GVBD期卵母细胞率和MII 期卵母细胞率有增加趋势，但无统计学意义（*p>* 0.05）；而与miR-133b

inhibitor组比较，miR-133b mimic组的GVBD期卵母细胞率和MII期卵母细胞率存在显著差异，提示miR-133b mimic可诱导卵母细胞的成熟，而miR-133b

inhibitor可抑制卵母细胞的成熟。分析出现这样结果的可能原因是：一、由于细胞显微注射技术要求很高、时限严格、卵母细胞对体外温度、体外培养液的渗透压变化敏感等，因此实验中体外培养卵母细胞死亡率较高，导致样本量偏低。二、我们所取得的卵母细胞已脱去卵丘-卵母细胞复合体，并无颗粒细胞等营养支持细胞。而我们的结果已证实TAGLN2主要在各级卵泡周围颗粒细胞包膜和胞浆表达；卵母细胞胞浆有少量表达；细胞核未见表达。当我们将miR-133b直接注入脱去卵丘-卵母细胞复合体的卵母细胞内后，miR-133b不能通过TAGLN2产生效应。而卵巢中富含颗粒细胞，采用卵巢多点注射法可以观察到miR-133b促进排卵的效应。

## 六、 小结

1. TAGLN2定位于卵泡中颗粒细胞膜和细胞质，其表达与卵母细胞成熟呈负相关。

2. miR-133b抑制小鼠卵巢TAGLN2 mRNA及蛋白的表达。

3. miR-133b促进小鼠卵母细胞成熟。

58

**讨 论**

近年来随着生活节奏加快、工作压力增加、环境污染恶化、饮食结构改变以及人们生育观念转变等，由此引起的生育能力下降问题也突显出来。目前全球约有3500-7000万对不育夫妇需要依靠辅助生殖技术（ART）治疗不育症。国家卫生和计划生育委员会的数据表明，2013年我国不孕症发病率7%～10%。我国需要依靠辅助生殖技术（ART）治疗不育症的不孕夫妇约有700-1500万。在不孕症的诸多病因中，广泛排卵障碍性不孕是女性不孕症常见的类型，约占25%～

35%。广东省普查2万对新婚夫妇，不孕率为13.3%[1-3]。虽然近两年我国每年进行试管婴儿周期已超过4万，但实际需要应用辅助生殖技术开展治疗的患者数以百万计，说明ART在中国有巨大需求，ART作为治愈不育症病人最终的先进医疗技术选择，未来在我国更大规模应用已不可避免。不孕的主要机理是卵泡发育成熟障碍所致无排卵，但卵泡发育成熟障碍的分子调控机制尚不十分明确。因此研究机体卵泡发育成熟障碍的分子调控机制，既可以为治疗提供新的药物靶点，也可以为改善ART结局提供新的思路。

卵泡发育成熟是一个极其复杂的过程，包括不同时期卵泡形态和功能的变化，其受内分泌、局部因子以及基因的调控。生理状态下卵泡的生长发育在多种激素的调控下精细有序地进行，包括雌激素、雄激素、黄体生成素（FSH）和卵泡刺激素（LH）。卵母细胞通过缝隙连接从周围的颗粒细胞中摄取小分子代谢物，以弥补不足[53]。卵泡刺激素( FSH)在卵泡成熟及颗粒细胞发育过程中是必需的，雌激素可促进FSH受体( FSHR) mRNA的表达。雌激素与黄体生成素( LH)和FSH协同作用，可改变颗粒细胞的基因表达及分化[54]。研究发现，卵泡期高水平LH使颗粒细胞过早黄素化，颗粒细胞与卵母细胞之间的联系受损，导致卵细胞减数分裂提前发生，引发了信号转导异常，导致卵泡闭锁[55]。

MicroRNA（miRNA）是一种19-25nt长的内源性小分子非编码RNA，miRNA通过与靶目标mRNA3′端非编码区(3'UTRs)结合，介导靶目标mRNA的降解、翻译抑制和脱腺苷化。目前已发现1000多种miRNA存在于人类基因组中，据估计，大约有60％的人类蛋白质编码基因受miRNA调节，对许多蛋白质的表达有重要作用[3]。有越来越多的研究表明miRNA在多种生物学过程中发挥着重要作用，包括细胞增殖、分化、凋亡和细胞的死亡，也与特定器官的形态发生和人

59

类疾病的发病机制密切相关[56-57]。

研究已表明，miRNA在卵泡发育和卵巢功能调控方面发挥作用[2、57]。近年来，研究发现miRNAs可特异性地调控女性生殖器官的发育和成熟过程[57]，多种miRNA在人卵巢中表达[59]，其中表达数量最多的十种miRNA分别是miR-143-3p、miR-125b、let-7b、let-7a、miR-16、miR-126、miR-99a、miR-26a、miR-29a、let-7c。卵巢内miRNA的紊乱表达可引起卵泡发育障碍而导致女性生育能力下降或不孕。研究表明，患有不孕症妇女与正常女性组相比，卵巢颗粒细胞和卵丘细胞中miR-211、miR-17–5p、miR-542–3p、miR-23a、miR-23b等多种miRNA的表达明显不同，它们可以通过靶向作用于IL-1β、StAR、COX-2和CYP-19A1等多种因子而发挥调控卵泡发育和成熟的作用[60-62]. Yang S等最近研究证实miRNA参与启动始基卵泡生长过程，该研究通过对比3日龄和5日龄新生小鼠卵巢miRNA表达谱发现有24种miRNA的表达呈现明显变化，进行通路富集分析发现：其中表达上调的miRNA调节48条信号转导通路，表达下调的miRNA调节29条信号通路。并且在TGF-β信号通路中，miR-145通过调控Tgfbr2、Acvr1b、Smad3和Smad5等靶基因而发挥作用。miR-145可通过直接靶向作用于TGF-βR2和下调TGF-β/Smad信号转导通路活性的方式抑制始基卵泡生长启动；采用miR-145拮抗剂（antagomir）下调miR-145的表达则可以明显降低始基卵泡的数目并增加生长卵泡的数目，可见miR-145在抑制始基卵泡生长启动和维持始基卵泡池静止方面起着重要作用[17]。S. Assou等[19]通过采用深度测序方法研究miRNA在体外受精妇女卵母细胞和卵丘细胞中的表达发现，在

MII期卵母细胞中miR184、miR100和miR10A高表达，而在卵丘细胞中miR29a、

miR30d、miR21、miR 93、miR 320a、miR 125a和let7家族呈现高表达。Sang等[63]在研究miRNA在人卵泡液中的表达时发现，表达数量最多的十四种miRNA依次为miR-483–5p、miR-574–3p、miR-518f、miR-191、miR-193b、miR-1274B、miR-320、miR-720、miR-520c-3p、miR-24、miR-132、miR-146a、miR-222和miR-1290. 越来越多的研究表明，miRNA主要通过作用于颗粒细胞来调节卵巢功能。既往研究发现在辅助生殖妇女卵巢颗粒细胞和卵丘细胞中，miR-211、miR-17-5p、miR-542-3p、miR-23a、miR-23b等多种miRNA高表达[64]。Sirotkin等[65]为了探索miRNA在人体卵巢颗粒细胞中的作用，将187种人工合成的内源

60

性前体miRNA模拟物转染到原代培养的卵巢颗粒细胞中，发现miR-108、miR-7、miR-9、miR-105、miR-128、miR-132、miR-141、miR-142、miR-152、miR-188和miR-191等可显著增加细胞增殖标记物PCNA的表达，同时发现miR-15a、miR-96、miR-92、miR-124、miR-18、miR-29a、miR-125a、miR-136、miR-147、miR-183和miR-32等可增加促凋亡标记物Bax的表达。Yang等[66]在研究人卵巢颗粒细胞中miR-23a的表达及作用时发现，miR-23a高表达可以增加卵巢颗粒细胞凋亡率。

虽然研究表明有不少miRNA参与了卵泡的发育过程，但是有关miRNAs的研究还有许多需回答的问题。**例如，细胞中是否还存在更多的对基因表达起调控作用的未被我们发现的非编码RNAs，它们是否参与卵泡发育基因的表达转录后调控？已经被发现的miRNA在细胞中是否还起着一些不为人知的作用呢？这些都有待于进一步研究和探索。**

在本研究中，我们采用miRNAs微阵列芯片分析用含IGF-1的培养液培养GV期和MI期卵母细胞miRNAs的表达情况。发现在含有IGF-1的培养液培养的GV期卵母细胞中有145个miRNAs表达上调，200个miRNAs表达下调；含有IGF-1的培养液培养的MI期人卵母细胞中发现有345种差异性表达的miRNAs，其中145种表达上调，200种表达下调。其中miR-133b上调32.74倍。而在GV期卵母细胞中，未见miR-133b有表达差异。说明在不同阶段卵泡的发育过程中，miR-133b的表达具有显著性差异。

研究表明，miR-133b具有广泛组织表达性[40-41]. miR-133b靶向不同的蛋白将产生不同的生理功能。例如，靶向抗凋亡蛋白-Fas凋亡抑制因子(FAIM)，产生抗前列腺肿瘤的作用[42]；靶向RhoA，影响脊髓再生[43]；靶向FGFR1，抑制胃癌细胞的生长[44]；激活ERK及AKT1信号通路，促进宫颈癌的发生[45]；靶向MyoD，促进骨格肌发育[46]。最新的研究表明，在小鼠颗粒细胞中，miR-133b直接结合Foxl2 mRNA-3′UTR，抑制Foxl2的表达，增加Foxl2介导转录的类固醇激素相关基因StAR和CYP19A1的表达，促进颗粒细胞分泌雌激素[21]。该项研究和我们的结果，均提示miR-133b参与了卵泡的发育。

miR-133b在卵泡发育过程中承担的角色及如何发挥生物学功能？我们首先用生物信息学的方法预测miRNA的靶基因。分析表明，*TAGLN2* 是miR-133b

61

的一个靶基因。我们的双荧光素酶报告基因系统实验证实了miR-133b和*TAGLN2*直接作用位点为TAGLN2-3'UTR区215-250位核甘酸序列。为了阐明miR-133b对TAGLN2 的调节作用，我们采用化学合成的方法，合成miR-133b 模拟物

（miR-133b mimic）、miR-133b抑制物（miR-133b inhibitor）以及它们相应的阴性对照。miR-133b mimic可增强内源miRNA的调控作用，降低细胞内靶蛋白表达量。miR-133b inhibitor特异地靶向抑制miR-133b分子，可以削弱内源miRNA的基因沉默效应，提高靶蛋白表达量。我们将miR-133b mimic、miR-133b inhibitor和它们阴性对照剂转染入人293T细胞中，分别采用实时定量PCR和免疫印迹检测*TAGLN2*mRNA及蛋白表达情况。结果显示，miR-133b mimic可以下调*TAGLN2*mRNA及蛋白的表达水平，miR-133b inhibitor组则上调*TAGLN2*mRNA及蛋白表达水平。提示miR-133b在转录后水平负性调节*TAGLN2*的表达。但在转染miR-133b inhibitor的细胞中*TAGLN2mRNA*及蛋白的表达低于miR-133b inhibitor阴性对照组，我们暂不清楚出现这种现象原因。

TAGLN2是一种分子量大小为22kD的蛋白，其编码基因定位于第11号染

色体长臂11q23.2，该基因含有一个最大的首要基因内区和3个短基因内区[23-25]. TAGLN2是TAGLN同族体，是钙调节蛋白家族中的一员，钙调节蛋白可结合肌动蛋白、肌钙蛋白和肌球蛋白，参与细胞骨架的形成，肌肉收缩和细胞粘附等，对细胞的增殖和分化、细胞内信号通路和调节分子形态学有重要作用[23]。以往的研究表明，TAGLN存在于多种组织中，包括子宫、膀胱、胃、前列腺、脊柱以及卵巢等组织[25]。但对TAGLN2的研究大多局限在肿瘤的发生方面，认为TAGLN2抑制肿瘤发生。例如，Zhang Yanbin等采用激光捕获显微切割技术结合定量蛋白质组分析，发现TAGLN2是结肠癌的生物标记分子[67]；TAGLN2参与他汀类药物抗血管生成效应，抑制肿瘤生成[68]；TAGLN2是miR-1的靶点，沉默TAGLN2可以抑制头颈部鳞癌细胞的增生和侵袭[69]等。但也有研究表明，TAGLN2可作为TGF-β的下游分子，当Smad4、Smad3、Smad1与TAGLN2启动子区域CAGA盒结合后，可以引起TGF-β对转录阶段TAGLN2的激活[30]。而在TGF-β介导卵泡成熟的信号通路中，转录因子Smad4(Sma- and Mad-related protein 4)是这条信号通路中至关重要的因子之一，在调控卵巢卵泡生长和雌性生育方面，特别是在原始卵泡转变成初级卵泡阶段，具有重要作用[70]。特异性敲除小鼠卵巢Smad4基因后可导致不育，主要是卵泡发生异常，如严重的卵丘细

62

胞异常以及GCs过早发生黄体化[28-29]。这提示了TAGLN2参与了TGF-β介导卵泡成熟的信号通路，TAGLN2可能是卵泡发育过程中的一个转录调节分子。为探讨TAGLN2是否参与了卵母细胞发育成熟过程的调控，我们首先采用免疫印迹、免疫组织化学、免疫荧光证实了TAGLN2在卵巢的表达情况。结果表明：

TAGLN2在小鼠卵巢各发育阶段的卵泡均有表达；其中排卵前卵泡表达最低。这些研究都与已有文献结果报道一致。免疫荧光染色显示TAGLN2在小鼠卵母细胞中也有表达，定位于细胞浆。且表达水平随卵母细胞的成熟逐渐降低。这说明

TAGLN2在不同生长阶段的卵母细胞发育过程中呈现负调节作用。

我们采用卵巢多点注射法研究miR-133b 对小鼠排卵情况的影响及对卵巢

TAGLN2表达的影响。小鼠卵巢分别注射miR-133b mimic后，小鼠GV期卵母细胞数和MII期卵母细胞数分别32.25±2.68个和19.38±1.93个。小鼠卵巢分别注射miR-133b inhibitor后，小鼠GV期卵母细胞数和MII期卵母细胞数分别为

21.50±1.44个和12.75±0.84个。注射miR-133b mimic组小鼠GV期卵母细胞数和MII期卵母细胞数显著高于小鼠卵巢注射miR-133b inhibitor组，差别具有统计学意义（*p*<0.05）。而miR-133b mimic 处理组与对照组相比，GV 期卵泡由

29.00±3.90个增加32.25±2.68个；MII期卵泡由16.00±1.31个增加到19.38±1.93

个（*p*> 0.05），差别无统计学意义。小鼠卵巢分别注射miR-133b mimic、miR-133b mimic NC、miR-133b inhibitor、miR-133b inhibito NC后，miR-133b mimic抑制TAGLN2 mRNA（\**p*=0.05<0.05）和蛋白（**\*\****p*=0.03<0.05）的表达（图3-8）；miR-133b inhibitor诱导TAGLN2 mRNA（#*p*=0.008<0.05）和蛋白（#*#p*=0.01<0.05）的表达。结果提示，miR-133b可抑制小鼠卵巢TAGLN2 mRNA和蛋白的表达。分析出现这样结果的原因可能涉及：我们用于动物实验的miRNA均为化学合成，与天然miRNA在稳定性方面存在一定差异。当直接将化学合成的miRNA注射至动物体内后，miRNA在体内吸收、分布、代谢、排泄等途径较为复杂。

在目前研究发育过程中，显微注射法是常用的外源基因导入方法，其对仪器及对实验操作技术人员要求高；对细胞损伤较大，通过物理方法将外源基因片段导入卵母细胞中，往往会对其膜结构或其他亚细胞结构造成损伤。我们用卵母细胞显微注射法分析miR-133b对小鼠卵母细胞成熟的影响，结果提示，与对照组的GVBD期卵母细胞率（61.6%）和MII期卵母细胞率（58.5%）比较，miR-133b

mimic组的GVBD期卵母细胞率（69.3%）和MII期卵母细胞率（66.7%）有增

63

加趋势，但无统计学意义（*p>* 0.05）；而与miR-133b inhibitor 组的GVBD期卵母细胞率（52.0%）和MII期卵母细胞率（48.0%）比较，miR-133b mimic组的GVBD 期卵母细胞率（69.3%）和MII 期卵母细胞率（66.7%）存在显著差异

（\**p*=0.024<0.05, \*\**p*=0.017<0.05），提示miR-133b mimic可诱导卵母细胞的成熟，而miR-133b inhibitor可抑制卵母细胞的成熟。分析出现这样结果的可能原因是：一、由于细胞显微注射技术要求很高、时限严格、卵母细胞对体外温度、体外培养液的渗透压变化敏感等，因此实验中体外培养卵母细胞死亡率较高，导致样本量偏低。二、我们所取得的卵母细胞已脱去卵丘-卵母细胞复合体，并无颗粒细胞等营养支持细胞。而我们的结果已证实TAGLN2主要在各级卵泡周围颗粒细胞包膜和胞浆表达；卵母细胞胞浆有少量表达；细胞核未见表达。当我们将miR-133b直接注入脱去卵丘-卵母细胞复合体的卵母细胞内后，miR-133b不能通过TAGLN2产生效应。而卵巢中富含颗粒细胞，采用卵巢多点注射法可以观察明显的miR-133b促进排卵的效应。

随着研究不断深入，miRNA或可作为不孕不育生物标志物用于临床诊断及病情评估，miRNA模拟物或抑制剂也有可能发展成为治疗不孕不育的新型治疗药物。深入了解卵泡发育成熟障碍的机制，将为我们深入了解不孕不育的预防、诊断和治疗提供新思路。

64

结**论**

1. miR-133b是MI卵母细胞特异性高表达miRNA，其靶基因是TAGLN2，结合位点是TAGLN2的3’UTR第215-250位核苷酸序列。

2. miR-133b靶向抑制卵泡TAGLN2的表达，促进卵母细胞的成熟。

65

参考文献

[1] Chang EM, Song HS, Lee DR. et al In vitro maturation of human oocytes: Its role in infertility treatment and new possibilities. [J]. Clin Exp Reprod Med. 2014; 41(2): 41-6.

[2] De Berardis D, Mazza M, Marini S. et al Psychopathology, emotional aspects and psychological counselling in infertility: a review. [J] Clin Ter. 2014 May-Jun; 165(3): 163-9.

[3] Gudeloglu A, Brahmbhatt JV, Parekattil SJ. et al Medical management of male infertility in the absence of a specific etiology. [J]. Semin Reprod Med. 2014; 32(4): 313-8.

[4] Tavukcuoglu S, Al-Azawi T, Al-Hasani S et al Using Fresh and Frozen Testicular Sperm Samples in Couples Undergoing ICSI-MicroTESE Treatment. J Reprod Infertil. 2013; 14(2): 79-84.

[5] Mtango NR, Latham KE, Sutovsky P. et al Deubiquitinating enzymes in oocyte maturation, fertilization and preimplantation embryo development. [J] Adv Exp Med Biol. 2014; 759: 89-110.

[6] Cecconi S, Rossi G, Castellucci A. et al Endocannabinoid signaling in mammalian ovary. [J] Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2014; 178: 6-11.

[7] 庄广伦. 现代辅助生育技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 123, 10-15.

[8] Nogueira D, Sadeu J C, Montagut, J. In vitro oocyte maturation: current status. [J] Semin Reprod Med; 2012, 30(3); 199-213.

[9] M inegishi T, Hirakawa, Kishi H et al1. A role of insu lin- like growth factor for follicle- stimulating hormone receptor expression in rat granulose cells, BiolReprod, 2000, 62 ( 2): 325.

[10] Nicolas J. Lehrbach, Cecilia Castro, et al. Post-developmental microRNA expression is required for normal signaling physiology, and regulates aging in parallel to insulin/IGF-1 in C. elegans. RNA. 2012, 18: 2220-2235.

66

[11] Yıldırım K, Vural MR, KüplülüS. et al The effects of EGF and IGF-1 on FSH-mediated in vitro maturation of domestic cat oocytes derived from follicular and luteal stages. [J]. Reprod Biol. 2014; 14(2): 122-7.

[12] Reverchon M, Cornuau M, Cloix L. et al Visfatin is expressed in human granulosa cells: regulation by metformin through AMPK/SIRT1 pathways and its role in steroidogenesis. [J]. Mol Hum Reprod. 2013; 19(5): 313-26.

[13] Yu Y, Yan J, Li M. et al Effects of combined epidermal growth factor, brain-derived neurotrophic factor and insulin-like growth factor-1 on human oocyte maturation and early fertilized and cloned embryo development. [J]. Hum Reprod. 2012; 27(7): 2146-59.

[14] Jason Baley and Julang Li; MicroRNAs and ovarian function. Journal of Ovarian Research; 2012; 5: 8.

[15] Lei Lei, Shiying Jin, Gabriel Gonzalez, et al． The regulatory role of Dicer infolliculogenesis in mice. Mol Cell Endocrinol. 2010, 315(1-2): 63.

[16] Tang F, Kaneda M, O'Carroll D, et al. Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development. Genes Dev. 2007, 21: 644–648.

[17] Yang S, Wang S, Luo A, et al. Expression patterns and regulatory functions of microRNAs during the initiation of primordial follicle development in the neonatal mouse ovary. 2013, 27; 89(5): 126.

[18] White YA, Woods DC, Takai Y et al Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women. Nature Medicine. 2012; 18(3): 413-421.

[19] S. Assou, T. Al-edani, D. Haouzi, et al. MicroRNAs: new candidates for the regulation of the human cumulus–oocyte complex. Human Reproduction, 2013, 28(11); 3038–3049.

[20] Kim YJ, Ku SY, Kim YY, et al. MicroRNAs transfected into granulose cells may regulate oocyte meiotic competence during in vitro maturation of mouse follicles [J]. Human Reprod. 2013, 28: 3050-3061.67

[21] Anyi Dai, Haixiang Sun, Ting Fang, et al. MicroRNA-133b stimulates ovarian estradiol synthesis by targeting Foxl2. [J]. FEBS Letters, 2013, 587; 2474–2482.

[22] Creighton C J, Benham A L, Zhu H, et al. Discovery of novel microRNAs in female reproductive tract using next generation sequencing [J]. PloS one, 2010, 5(3): e9637.

[23] Camorett-imercado, B. Forsythe, S. M. LeBeau, et al. Expression and cytogenetic localization of thehuman SM22 gene (TAGLN) [J]. Genomics, 1998, 49: 452-457.

[24] Dong LH, Lv P, Han M. Roles of SM22αin cellular plasticity and vascular diseases. [J]. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets. 2012; 12(2): 119-25.

[25] Assinder SJ, Stanton JA, Prasad PD. Transgelin: an actin-binding protein and tumour suppressor. [J] Int J Biochem Cell Biol. 2009; 41(3): 482-6.

[26] Dos, Santos Hidalgo G, Meola J, Rosa E Silva JC et al TAGLN expression is deregulated in endometriosis and may be involved in cell invasion, migration, and differentiation. [J]. Fertil Steril, 2011, 96; 700-703.

[27] Naïma Kaci -Ouchfoun, Djamila Izemrane, Abdelkrim Boudrissa et al Transgelin: An androgen-dependent protein identified in the seminal vesicles of three Saharan rodents. [J]. Theriogenology, 2013, 80, 748–757.

[28] Pangas SA, Li X, Robertson EJ, et al. Premature luteinization and cumulus cell defects in ovarian-specific Smad4 knockout mice. [J] Mol Endocrinol. 2006; 20(6): 1406-1422.

[29] Yu C, Zhang Y L, Fan H Y. Selective Smad4 knockout in ovarian preovulatory follicles results in multiple defects in ovulation[J]. Molecular Endocrinology, 2013, 27(6): 966-978.

[30] Shiyou Chen, Magdalena Kulik, Robert J. Lechleider Smad proteins regulate transcriptional induction of the SM22a gene by TGF-β. [J]. Nucleic Acids Research, 2003; 31(4): 1302-131.

[31] Hossain M M, 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.

68

[32] Roth L W, 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.

[33] Sethi S, Ali S, Kong D et al. Clinical implication of microRNAs in molecular pathology. [J]. Clin Lab Med. 2013; 33(4): 773-86.

[34] Xu YW, Wang B, Ding CH, et al. Differentially expressed micoRNAs in human oocytes [J]. J Assist Reprod Genet. 2011, 28: 559-566.

[35] Adammek M, Greve B, Kässens N, et al. MicroRNA miR -145 inhibits proliferation, invasiveness, and stem cell phenotype of an in vitro endometriosis model by targeting multiple cytoskeletal elements and pluripotency factors[J]. Fertility and sterility, 2013, 99(5): 1346-1355. e5

[36] LI X, ZHAO Z, GAO L. Regulation and Expression of Tagln2 in Early Rabbit Pregnant Uterus[J]. Journal of Reproduction and Contraception, 2010, 21(1): 27-34.

[37] Prinjha RK, Shapland CE, Hsuan JJ, et al. Cloning and sequencing of cDNAs encoding the actin cross-linking protein transgelin defines a new family of actinassociated proteins. Cell Motil Cytoskeleton. 1994; 28: 243-255.

[38] Dvorakova M, Nenutil R, Bouchal P. Transgelins, cytoskeletal proteins implicated in different aspects of cancer development[J]. 2014.

[39] Yu H, Königshoff M, Jayachandran A, et al. Transgelin is a direct target of TGF-β/Smad3-dependent epithelial cell migration in lung fibrosis[J]. The FASEBJournal, 2008, 22(6): 1778-1789.

[40] Estella C, Herrer I, Moreno-Moya JM, et al. miRNA Signature and Dicer Requirement during Human Endometrial Stromal Decidualization In Vitro. PLoS ONE. 2012, 7(7): e41080.

[41] Nothnick WB, Healy C, et al. Estrogen induces distinct patterns of microRNA expression within the mouse uterus. Reproductive Sciences. 2010, 17(11): 987-994.

[42] Juan P. Patron, Annika Fendler, Matthias Bild, et al MiR-133b Targets Antiapoptotic Genes and Enhances Death Receptor-Induced Apoptosis. [J]. PLos One 2012, 7(4); e3534569

[43] Young-Mi Yu, Kurt M. Gibbs, Jonathan Davila, et al MicroRNA miR-133b is essential for functional recovery after spinal cord injury in adult zebrafish. [J]. European Journal of Neuroscience, 2011, 33(9); 1587-1597.

[44] Dacheng Wen, Songhe Li, Fujian Ji et al miR-133b acts as a tumor suppressor and negatively regulates FGFR1 in gastric cancer. [J]. Tumor Biol. 2013, 34(2); 793-803.

[45] Qin W, Dong P, Ma C, et al MicroRNA-133b is a key promoter of cervical carcinoma development through the activation of the ERK and AKT1 pathways. [J]. Oncogene, 2012; 31(36): 4067-4075.

[46] Koutsoulidou A, Mastroyiannopoulos NP, Furling D, et al Expression of miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-206 increases during development of human skeletal muscle. [J]. BMC Dev Biol. 2011, 11(34);. 1-9.

[47] He´bert SS, De Strooper B Alterations of the microRNA network cause neurodegenerative disease. Trends Neurosci 2009, 32: 199–206.

[48] BoštjančičE, Jerše M, GlavačD, et al. miR-1, miR-133a/b, and miR-208a in human fetal hearts correlate to the apoptotic and proliferation markers[J]. Experimental Biology and Medicine, 2014: 1535370214546268.

[49] Lees-Miller J P, Heeley D H, Smillie L B, et al. Isolation and characterization of an abundant and novel 22-kDa protein (SM22) from chicken gizzard smooth muscle[J]. Journal of Biological Chemistry, 1987, 262(7): 2988-2993.

[50] Zhang J C L, Helmke B P, Shum A, et al. SM22βencodes a lineage-restricted cytoskeletal protein with a unique developmentally regulated pattern of expression[J]. Mechanisms of development, 2002, 115(1): 161-166.

[51] Coyral-Castel S, Brisard D, TouzéJ L, et al. Analysis of in vivo oocyte maturation, in vitro embryo development and gene expression in cumulus cells of dairy cows and heifers selected for one fertility quantitative trait loci (QTL) located on BTA3[J]. Theriogenology, 2012, 77(9): 1822-1833.

[52] Villeneuve D L, Garcia-Reyero N, MartinovićD, et al. Influence of ovarian stage on transcript profiles in fathead minnow ( Pimephales promelas) ovary tissue[J]. Aquatic toxicology, 2010, 98(4): 354-366.

[53] Picton HM, Harris SE, Muruvi W, et al． The in vitro growth and maturation of

70

Follicles [J]. Reproduction, 2008, 136( 6): 703 -715.

[54] Nogueira D, Sadeu J C, Montagut, J. In vitro oocyte maturation: current status. [J] Semin Reprod Med; 2012, 30(3); 199-213.

[55] Kayampilly P P, Menon K M． Follicle-stimulating hormone inhibits adenosine 5'-monophosphate activated protein kinaseactivation and promotes cell proliferation of primary granulosa cells in culture through an Akt–dependent pathway. [J]. Endocrinology, 2009, 150( 2): 929 -935．

[56] Zavadil J, Ye H, Liu Z, et al. Profiling and functional analyses of microRNAs and their target gene products in human uterine leiomyomas. PLoS ONE. 2010; 5e12362.

[57] Nayoung Suh, Lauren Baehner, Felix Moltzahn, et al. MicroRNA Function IsGlobally Suppressed in Mouse Oocytes and Early Embryos. Curr Biol. 2010; 20(3): 271–277.

[58] Moreno-Moya JM, Vilella F, Simón C. MicroRNA: key gene expression regulators. [J]. Fertil Steril. 2014; 101(6): 1516-23.

[59] Mtango NR, Latham KE, Sutovsky P. et al Deubiquitinating enzymes in oocyte maturation, fertilization and preimplantation embryo development. [J] Adv Exp Med Biol. 2014; 759: 89-110.

[60] ToloubeyDokhti T, Alford C, Alkatanani Y, et a1. The expression of microRNA(miRNA), mir-17, mir-211 and mir-542 and their target genes, StAR, IL-lb and Cox2 in follicular cells derivedfrom women undergoing art[J]. FertilSteril, 2007, 88: 165-166.

[61] Chen Y, Jefferson WN, Newbold RR, et al. Estradiol, progesterone, and genistein inhibit oocyte nest breakdown and primordial follicle assembly in the neonatal mouse ovary in vitro and in vivo. [J]. Endocrinology, 2007, 148, (8): 3580-3590.

[62] Otsuka M, Zheng M, Hayashi M, et al. Impaired microRNA processing causes corpus luteum insufficiency and infertility in mice. J Clin Invest. 2008; 118: 1944-54．

[63] 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

71

Associated with polycystic ovary syndrome in vivo[J]. J Clin Endocrinol Metab,2013,98(7):3068-3079.

[64] Alford C, Toloubeydokhti T, lkatanani Y, et a1． The expression of

MicroRNA(miRNA) mir-23a and 23b and their target gene, CYPl 9A1(aromatase) in follicular cells obtained from women undergoing ART[J]. Fertil

Steril. 2007; 88:1 66-167.

[65] Sirotkin A V, Laukova M, Ovcharenko D, et al. Identification of microRNAs controlling human ovarian cell proliferation and apoptosis[J]. J Cell Physiol, 2010, 223(1): 49-56.

[66] 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.

[67] Zhang Y, Ye Y, Shen D, et al Identification of transgelin-2 as a biomarker of colorectal cancer by laser capture microdissection and quantitative proteome analysis. [J]. Cancer Sci. 2010; 101(2): 523-529.

[68] Xiao Y, Li Y, Han J, et al Transgelin 2 participates in lovastatin-induced anti-angiogenic effects in endothelial cells through a phosphorylated myosin light chain-related mechanism. [J]. PLoS One. 2012; 7(10): e46510.

[69] Nohata N, Sone Y, Hanazawa T, et al. miR-1 as a tumor suppressive microRNA targeting TAGLN2 in head and neck squamous cell carcinoma. [J]. Oncotarget. 2011; 2(1-2): 29-42.

[70] Wang Z P, Mu X Y, Guo M, et al. Transforming growth factor-βsignaling participates in the maintenance of the primordial follicle pool in the mouse ovary[J]. Journal of Biological Chemistry, 2014, 289(12): 8299-8311.

72

附 **录**

重组质粒测序结果

> TAGLN2-3-UTR\_1. seq CAGAGAATTTCGGCCTGATCAAGGCGAAGAGGGCGAGAAACTGTGTCTTGGAAATACCTTCGTCGA GACATGCCCCAGCAAGATCATGCGAAACTGAGCTGAGAGTCGCTGCTACTGAGCATTCAGAGAAGG CGAGTAGACGCTACCTCTCCTGCTCGCGAGATCCTCTCGTAGGAGGCAGCCCGACGTCGTCCAGAT TGTCGCACTACACGCTACTTCGGGCCAGCGACGATCTGCCTAAGATGTTCATCGAGTCCGACCCTG GGTTCTTTTCCAACGCTATTGTCGAGGGAGCTAAGAAGTTCCCTAACACCGAGTTCGTGAAGGTGA AGGGCCTCCACTTCAGCCAGGAGGACGCTCCAGATGAAATGGGTAAGTACATCAAGAGCTTCGTGG AGCGCGTGCTGAAGAACGAGCAGTAATTCTAGGCGATCGCTCGAGCTCCCACGAATGGTTAATATA TATGTAGATATATATTTTAGCAGTGACATTCCCAGAGAGCCCCAGAGCTCTCAAGCTCCTTTCTGT CAGGGTGGGGGGTTCAGCCTGTCCTGTCACCTCTGAGGTGCCTGCTGGCATCCTCTCCCCCATGCT TACTAATACATTCCCTTCCCCATAGCCATCAAAACTGGACCAACTGGCCTCTTCCTTTCCCCTGGG ACCAAAATTTAGGGGCCTCAGTCCCTCACCGCCATGCCCTGGCCTATTCTGTCTCTCCTTCTTCCC CCTGGCCTGTTCTGTCTCTGAGCTCTGTGTCCTCCGTTCATTCCATGGCTGGGAGTCACTGATGCT GCCTCTGCCTTCTGATGCTGGACTGGCCTTGCTTCTACAAGTATGCTTCTCCCACAGCTGTGGCTG CAGGAACTTAATTTATAGGGAGGAGCCTGTGGCAGCTGCTGCCCCAGCCACAGCTGCACTGACTGT GCTCACCACACATCTGGGGCAGCCTTCCCTGGCAGGGGCCCTCGTGGCTTCTCATTTTCCATTCCC TTCACTGTGGCTAAGGGGTGGGGTGAGGGGATGGAGAGGGAGGGCTGCCTACCATGGTCTGGGGCT TGAGGAAGATGAGTTTGTTGAGCGGCCGCTGGCCGCAATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTG TGTGTTGGTTTTTTGTGTGAGGATCTAAATGAGTCTTCGGACCTCGCGGGGGCCGCTTAAGCGGTG GTTAGGGTTTGTCTGACGCGGGGGGAGGGGGAAGGAACGAAACACTCTCATTCGGAGGCGGCTCGG GGTTTGGTCTTGGTGGCCACGGGCACGCAAAGAGCGCCGCGATCCTCTTAAGCACCCCCCCCGCCC TCCGTGGAGCGGGGTTTGGTCGGCGGATGGTACTGGCGGGCCGCTGACTCAGGCCGGTCGCGCGCC CCAGAGTGTGACCTTTTCGGTCTGCTCGCAGACCCCGGGTCGTGACACCCTCGGCGGCACGACTCC CTGGTCCTAGCTCATGTGACGTAAACTGGACAGGCTCTTGGAACATC

73

>TAGLN2-3-UTR\_m\_5. seq GATTGCCTGATCAAAGGGAGAGGCGAGAAATGTGCCTGAATTACTCTCGTCGAGACATGTCCAGGC AAGATCATGCGAAACTGAGCTGAGGAGTCGTGCTACTGAGCATTCAGAGAGGCGAGTAGACGCTAC CTCTCTGCTCGCGAGATCCTCTCGTAGGAGGCAGCCCGACGTCGTCCAGATGTCCGCAACTACACG CTACATTCGGGCCAGCGACGATCTGCCTAAGATGTTCATCGAGTCCGACCCTGGGTTCTTTTCCAA CGCTATTGTCGAGGGAGCTAAGAAGTTCCCTAACACCGAGTTCGTGAAGGTGAAGGGCCTCCACTT CAGCCAGGAGGACGCTCCAGATGAAATGGGTAAGTACATCAAGAGCTTCGTGGAGCGCGTGCTGAA GAACGAGCAGTAATTCTAGGCGATCGCTCGAGCTCCCACGAATGGTTAATATATATGTAGATATAT ATTTTAGCAGTGACATTCCCAGAGAGCCCCAGAGCTCTCAAGCTCCTTTCTGTCAGGGTGGGGGGT TCAGCCTGTCCTGTCACCTCTGAGGTGCCTGCTGGCATCCTCTCCCCCATGCTTACTAATACATTC CCTTCCCCATAGCCATCAAAACTTAGATCGCTGGCCTCTTCCTTTCCCCTGTAGATCGATTTAGGG GCCTCAGTCCCTCACCGCCATGCCCTGGCCTATTCTGTCTCTCCTTCTTCCCCCTGGCCTGTTCTG TCTCTGAGCTCTGTGTCCTCCGTTCATTCCATGGCTGGGAGTCACTGATGCTGCCTCTGCCTTCTG ATGCTGGACTGGCCTTGCTTCTACAAGTATGCTTCTCCCACAGCTGTGGCTGCAGGAACTTAATTT ATAGGGAGGAGCCTGTGGCAGCTGCTGCCCCAGCCACAGCTGCACTGACTGTGCTCACCACACATC TGGGGCAGCCTTCCCTGGCAGGGGCCCTCGTGGCTTCTCATTTTCCATTCCCTTCACTGTGGCTAA GGGGTGGGGTGAGGGGATGGAGAGGGAGGGCTGCCTACCATGGTCTGGGGCTTGAGGAAGATGAGT TTGTTGAGCGGCCGCTGGCCGCAATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTT GTGTGAGGATCTAAATGAGTCTTCGGACCTCGCGGGGGCCGCTTAAGCGGTGGTTAGGGTTTGTCT GACGCGGGGGGAGGGGGAAGGAACGAAACACTCTCATTCGGAGGCGGCTCGGGGTTTGGTCTTGGT GGCCACGGGCCACGCAAAAGAGCGCCGCGATCCTCTTAAGCACCCCCCCGCCCTCCGTGGAGCGGG GGTTTGGTCGGCGGGTGGTAACTGGCGGGCCGCTGACTCGGCGGGTCCACGCCCAGATTGATCTTT TCGTCTGCTCCAACCCCGGCGCTCCGCTCGCAGCTACGGCTCTCTGATCTTGCTCAGGTACGTTAC CTTGACGGCTCGAGCATCCTCCGACTGCGTTGATTACCGGTAACCTTTGCG

74

综述

micro RNA调控Th殖发育及与PCOS关系的研究进展

**摘要：**女性生殖功能的正常维持有赖于生殖细胞和体细胞之间的相互作用及激素、内因子和基因及时准确的调节。这些物质调控生殖系统各个器官的细胞活动，包括细胞生长、增殖、分化和凋亡，其功能紊乱会导致生殖功能障碍，如不孕、多囊卵巢综合征、生殖道肿瘤的发生等。miRNA是一类单链的，内源性非编码的小RNA，大小一般为18-24核苷酸，通过调节靶基因的转录后水平，调节细胞的发育、增殖、凋亡、分化和功能等。目前研究发现miRNA在胚胎发育、卵巢、子宫、输卵管发育及病变过程中有重要的调控作用。本文将对miRNA的生物合成，以及其表达在女性生殖系统正常和病理情况下可能的调控作用作一综述。

**关键词：**micro RNA；卵泡发育；子宫；输卵管；卵巢； PCOS

正常的生殖功能是复杂的多因素过程。性激素、内因子和基因的及时准确地调控对于正常生殖器官的发育和功能、卵泡胚胎的发育等都是必须的。这些因素的紊乱可以导致生殖功能障碍从而导致不孕、多囊卵巢综合征、子宫内膜异位症以及生殖道肿瘤的形成。近年来研究发现，无论在生理还是病理的情况下，

miRNA与特异性的靶基因结合，从而在转录后水平引起靶mRNA的剪切或是翻译的抑制，参与调控细胞的增殖、分化、凋亡、迁移、炎症反应、肿瘤的发生和新陈代谢等[1-4]，从而影响女性生育功能。然而目前miRNA对女性生殖功能影响的研究有限。在此将讨论miRNA在女性生殖道细胞活动中的表达以及可能的调控作用。

**1、miRNA的Th物合成和作用：**

micro RNA（miRNA）是一类单链的，内源性非编码的小RNA，大小一般为18-24核苷酸（nts），通过调节靶基因的转录后水平，是一类具有全局调控作用的小分子调控物，参与调控细胞增殖、分化、凋亡、迁移和肿瘤发生等[5]。第一个被确认的miRNA是在线虫中首次发现的lin-4和let-7，随后多个研究小组在包括人类、果蝇、植物等多种生物物种中鉴别出数百个miRNA。它广泛存在于真核生物中，是一组不编码蛋白质的短序列RNA，其本身不具有开放阅读

75

框(ORF). miRNA的生物合成是一个多步骤复杂的过程。miRNA最初在核内被

RNA聚合酶II (pol II)转录成初级转录物（pri-miRNA），然后pri-miRNA 被

RNA核酸内切酶III Drosha和配体DGCR8剪切成约为60–80核苷酸序列，反向折叠成具有茎环结构的前体miRNA(pre-miRNA)。RAN-GTP和exportin 5将这种前体分子输送到细胞质中。随后，另一个RNase III Dicer将其剪切，产生双链miRNA（dsmiRNA），在解旋酶的作用下解链，生成一条21～23个核苷酸的成熟单链miRNA，其进入核蛋白复合体中形成RNA诱导的沉默复合体(miRNA-RISC) [5-6]。在miRNA的指引下，miRNA-RISC复合体与miRNA通过碱基互补配对结合发挥其对靶mRNA的调控作用。大部分miRNA基因存在于基因间以及基因内含子中，也有少数是存在于外显子或是构成整个内含子。因此

miRNA 的转录既可以是独立的，也可以存在于内含子或者是在外显子中与

mRNA一起转录[7-8]。

miRNA是一类高度保守的基因家族，其发挥作用的方式是作为一种引导性分子通过碱基配对与靶mRNA结合从而在转录后水平引起靶mRNA的剪切或是翻译的抑制，这种调控作用取决于miRNA与靶mRNA的3' UTR间碱基互补的程度。若两者互补程度高时，引起靶miRNA降解从而下调靶基因表达；当两者互补程度相对不高时，则通过抑制靶基因翻译调控基因表达。有研究证明mRNAs能够通过与靶基因启动子元件的特异性结合直接控制翻译[9-10]. miRNA的表达具有时空特异性，在物种间也具有较高的保守性，可能参与调节细胞和组织的功能特异性。对于miRNA对生殖功能中的调控作用，以及其在特定阶段调节生殖器官发育以及生殖系统疾病的研究，可以为生殖疾病提供新的靶向治疗手段。

**2、miRNA对Th殖发育的调控作用：**

**2.1 miRNA对胚胎的调控作用：**

胚胎发育是一个复杂和动态的过程，其受多种因素的影响。近年来，研究发现miRNA可能在胚胎发育过程中起重要的调控作用。Tang等在成熟小鼠卵母细胞中检测到miR-30、miR-16、let-7和miR-17-92家族，其中let-7和miR-17-92家族是受精卵中表达最丰富的母系miRNA[11]，它们提示了miRNA在卵子生发和早期胚胎发育起重要的动态调控，且由受精卵遗传的miR-17-92在卵子发生时表达增加，在2-细胞胚胎期后再次增加。由此可见miRNA作为

76

在后转录水平调控基因表达的重要分子，直接或间接调控部分母源基因的表达，它可能对卵母细胞早期减数分裂以及胚胎的发育起重要的作用。Tang等研究早期胚胎中miRNA的表达，这观察发现受精卵miRNA可能是由母体的卵母细胞遗传而来，而不是在受精卵中转录。且受精卵miRNA的表达模式在早期胚胎发育中具有动态的变化，在1-细胞和2-细胞之间，miRNA的表达水平减少60%，这表明母源miRNA可能在此期间退化。然而在2-细胞和4-细胞之间

miRNA的表达则增加-2.2倍[11]。这说明miRNA在不同的胚胎发育期间发生动态的变化，调控不同胚胎的发育。随后学者在受精卵中显微注射miR-135a拮抗剂，超过30%受精卵1-细胞卵裂受到抑制。另外在HeLa细胞和小鼠受精卵中miR-135a下调Siah1的表达，Siah1a的表达与miR-135a呈负相关。当同时注射Siah1a特异性抗体和miR-135a抑制剂时，大部分miR-135a抑制剂失效。实验表明miR-135a直接与Siah1 3' UTR端结合，下调Siah1的表达，通过泛素

-蛋白酶体途径调控E3泛素连接酶的降解，另外miR-135a也可能调控DNA趋化因子结合蛋白(kid)的表达[12]，从而影响受精卵卵裂和胚胎的发育。miR-98在不同种植时期的子宫内膜中的表达水平不同，在种植5-6 天的子宫内膜中

miR-98的表达水平低于种植3-4天和7-8天的子宫内膜，且在延迟种植的子宫内膜中miR-98的表达明显降低，低表达的miR-98促进子宫内膜基质细胞的增殖以及抑制凋亡，高表达的miR-98则有相反作用，这可能与miR-98靶向作用于Bcl-xl-3' UTR，抑制Bcl-xl翻译[13]。最近，研究人员采用miRNA芯片筛查围种植期和种植期大鼠子宫中的miRNA表达谱，研究发现在种植期的大鼠子宫中，有28种microRNA表达上调，29种microRNA表达下调，差异至少两倍以上。此外，miR-29a只在种植期子宫内中高表达，激活延迟种植和人工蜕膜化会增加miR-29a的表达水平，进一步研究显示促凋亡因子Bak1和Bmf以及抗凋亡因子Bcl-w是miR-29a的靶基因，且miR-29a与抗凋亡因子的结合能力较弱，过表达的miR-29a抑制子宫内膜基质细胞凋亡，这可能与miR-29a与促凋亡基因结合能力较强相关[14]。综上所述，miRNA通过特异性调节其靶基因mRNA和蛋白质的表达水平，从而在胚胎发育过程中起重要的调控作用，且

miRNA可能特异性调节胚胎的着床。

**2.2 miRNA对子宫的调控作用：**

77

在雌激素和孕激素的协同作用下，子宫内膜发生周期性变化。Hong等人发现Dicer1f1/f1、Amhr2Cre+雌性小鼠子宫重量只有野生型小鼠的三分之一，而且子宫平滑肌层和腺体都减少[15]。Nothnick等人用微阵列检测法在小鼠子宫发现445种miRNA。在雌激素的作用下10种miRNA表达明显存在差异，且雌激素通过雌激素受体途径显著上调mirn155、mirn429 和mirn451 的表达，显著下调

mirn181b 和mirn204 的表达[16]。根据此研究显示雌激素调节小鼠子宫特异性

miRNA的表达，这些miRNA可能在转录后或翻译水平参与受雌激素调控基因的表达。另外合成miRNA所需要的酶Drosha、Dgcr8、Exportin-5和Dicer1在小鼠子宫中表达，且卵巢类固醇激素通过各自的受体途径上调这些酶的表达，从而影响子宫基因的表达以及其生理改变[17]。此外在雌激素和孕激素同时作用下小鼠子宫Exportin-5 mRNA的表达明显上调，而仅用孕激素处理后Dicer1表达上调

[17]. 可见类固醇激素可能主要通过作用于Exportin-5和Dicer1来调节小鼠子宫

miRNA的合成，且类固醇激素通过在翻译水平调节miRNA合成酶的表达，从而影响子宫miRNA表达。学者发现蜕膜化的子宫内膜基质中有26种miRNA表达上调，17种miRNA表达下调[18]。另外miR-181、miR-183和miR-200在hESCs蜕膜化过程中表达下调，这些miRNA通过T细胞受体、细胞周期以及TGF-β信号传导途径等参与调节子宫内膜蜕膜化，而过表达的miR-96或miR-135b减少FOXO1和HOXA10的表达，从而特异性地减少IGFPB-1的分泌[18]。敲除Dicer

hESCs蜕膜化过程中，HOXA10的水平下降，且F-肌钙蛋白丝的结构发生改变[18]。这说明miRNA在子宫内膜蜕膜化过程中起重要的调控作用，研究蜕膜化子宫内膜miRNA的特异性表达以及调控机制，为子宫内膜蜕膜化缺陷性疾病提供新的治疗靶点。

Pan等人首先研究子宫内膜miRNA的表达情况，发现正常的子宫内膜中基质细胞和腺上皮细胞有32种miRNA表达存在差异，雌二醇使基质细胞miR-20a和miR-21的表达下调，miR-26a的表达上调；而醋酸甲羟孕酮（MPA）显著下调这三种miRNA的表达。在腺上皮细胞中，雌二醇下调miR-20a和miR-21的表达，上调miR-26a的表达；而醋酸甲羟孕酮则使miR-20a和miR-26a的表达上调，miR-21的表达下调[19]。此外，miR-125b、miR-21、miR-145、miR-26a、miR-23b、miR-29a和miR-99a在子宫内膜异位症患者的子宫内膜中表达则明显下调[19]。因

此认为 miRNA 广泛存在于子宫内膜中，且参与调节子宫内膜周期性以及病理性

78

改变，这种调控作用可能是通过TGF-β以及类固醇激素受体途径影响TGF-β、TGF-β受体、ERα、ERβ和PR的表达实现的[19]。随后Toloubey-dokhti等人以同样的方法研究异位子宫内膜miR-17-5p、miR-23a、miR-23b和miR-542-3p的表达情况，结果示miR-23b和miR-542-3p低水平表达。而游离的基质细胞中雌二醇增加miR-17-5p和miR-542-3p的表达，但下调miR -23a和miR-23b。而用

MPA处理后miR-17-5p和miR-542-3p表达上调，miR-23a表达下调，miR -23b无明显的改变。在颗粒上皮细胞中雌二醇增加miR-23a和miR-542-3p的表达，但下调miR-17-5p和miR-23b。而MPA处理后却导致miR-17-5p、miR-23a和miR -23b表达上调，miR -542-3p表达明显下调[20]。可见miRNA可能调控子宫内膜异位症的形成。最近也有研究认为子宫内膜miRNA可能调控细胞增殖。Liu等发现miR-141负性调节PTEN的表达，过表达的miR-14抑制PTEN蛋白质的表达，从而促进子宫内膜基质细胞的增殖，抑制凋亡以及降低胚胎着床率[21]。

Zhang等证明雌激素增加雌激素受体阳性的子宫内膜腺癌细胞的增殖，这与其上调BCL2和下调BAX的表达相关。而BAX是let7家族和miR-27a的靶基因，它的抑制作用发生于后转录水平[22]。随后学者研究认为子宫内膜样子宫内膜腺癌和子宫复杂型不典型增生中miR-200a/b/c、miR-141和miR-429表达上调，且anti-miR-141、anti-miR- 200c和anti-miR- 429抑制Ishikawa细胞发育，而miR- 200c可通过下调肿瘤抑制蛋白BRD7来调控HEC-1A和Ishikawa细胞增殖、生存和凋亡[23-25]. miRNA 也调节抑癌基因的表达。子宫内膜癌组织和

Ishikaw细胞失去FOXO1的调控后，miR-9、miR-27、miR-96、miR-128、miR-153、miR-182、miR-183和miR-186的表达上调。在HEC-1B细胞中过表达上述miRNA，除了miR-128外，其余miRAN都减少FOXO1蛋白的表达。以及用其抑制剂转染Ishikawa细胞，则导致细胞周期停止和细胞凋亡。另外还发现miR-7、miR-149、miR-449b和miR-204异常表达，其中miR-204通过与靶基因FOXO1结合调控子宫内膜腺癌HEC-1A细胞的迁移和侵入[26]。子宫内膜癌II型细胞中miR -125b表达上调，其可能是通过调节抑癌基因TP53INP1来调控体内外细胞的增殖和侵入[27]。上述表明这些miRNA可能参与调控对子宫内膜癌具有重要作用的相关基因，通过研究这些基因的特异性表达以及调控机制，为子宫内膜癌提供新的治疗靶点。

79

子宫肌层的主要作用是在分娩时提供收缩力，促进胎儿和胎盘娩出。Renthal等发现妊娠的子宫肌层中，miR-200家族的表达上调导致靶基因ZEB1/ZEB2水平下降，且小鼠和人类子宫肌层中ZEB1/ZEB2的下调与CXN43和OXTR表达上调相关。另外，在早产的小鼠模型中也证明子宫肌层的miR-200家族表达上调，

ZEB1/ZEB2表达下降。而且孕激素直接调控ZEB1的上调，ZEB1和ZEB2抑制收缩蛋白CXN43和OXTR的表达[28]。且过表达的miR-200a减少TUBB、CYP1B1、

CTBP2和蛋白质水平，抑制细胞发育[29]。因此miR-200家族通过调控其靶基因ZEB1/ZEB2的表达来调节孕妇内分泌的变化影响妊娠和分娩子宫的收缩力。另外学者在人类子宫颈中发现有226种miRNA表达，其中miR-223、miR-34b和miR-34c在足月分娩的宫颈中表达上调[30]。根据此研究，我们推测miRNA可能调控其靶基因的表达影响宫颈扩张、重塑和激活固有的免疫反应。因此探讨异常足月产和早产宫颈miRNA以及其潜在的靶基因的调控作用，为妊娠期宫颈疾病提供新的治疗靶点。

**2.3 miRNA对输卵管的调控作用：**

输卵管具有极其复杂而精细的生理功能，对拾卵、精子获能、卵子受精、受精卵输送及早期胚胎的生存和发育起着重要作用。与卵巢和子宫类似，在生殖周期中输卵管同样也经历周期性的变化，miRNA可能在这周期性的变化中起至关重要的重要。目前关于输卵管内miRNA的表达、调控及功能的研究甚少。Nagaraja等人比较野生型和Dicer1f1/f1、Amhr2Cre+雌性小鼠的输卵管miRNA表达谱，28种miRNA的表达下调，指出Wnt和β-catenin信号传导途径缺陷时小鼠有相似的输卵管缺陷，而Dicer1f1/f1、Amhr2Cre+雌性小鼠输卵管中β-catenin蛋白水平下调，因此，Dicer和miRNA可能参与调节Wnt信号途径相关蛋白的表达[31]。另外这些miRNA 可能通过转录后调控的方式调控靶基因Wnt5a、Hoxa9 和

Hoxa10的表达，从而影响正常输卵管的发育和功能[31]。与子宫类似，Dicer1f1/f1、

Amhr2Cre+雌性小鼠输卵管长度和直径少于正常小鼠的一半，且输卵管峡部平滑肌层减少或缺失，导致输卵管峡部变得脆弱。另外，Dicer1f1/f1、Amhr2Cre+雌性小鼠输卵管在妊娠第3、4天胚胎发育延迟，碎片增加，甚至退化，野生型雌性小鼠受孕第4天，囊胚全部通过子宫输卵管连接处进入子宫腔内，而Dicer1f1/f1、

Amhr2Cre+ 雌性小鼠的囊胚仍然滞留在输卵管中[15] ，可见miRNA影响雌性小鼠

80

输卵管的支持和运输能力。但目前miRNA对输卵管的调控作用研究甚少，需要进一步的科学研究阐述。

**2.4 miRNA对卵巢的调控作用：**

**2.4.1 miRNA对卵泡的调控作用。**

卵泡发育是一个极其复杂的过程，包括不同时期的卵泡形态和功能的改变，其受内分泌、局部因子和基因的调控。为了确保卵泡的发育和排卵功能正常进行，而调控卵巢的激素、因子和基因必须要准确、及时的表达，否则将会导致卵泡发育异常、凋亡、排卵障碍等。而基因通过表达产物反馈调控卵泡发育，且它们各自对卵泡发育的调节作用有所不同。

目前研究证明miRNA也参与了卵泡发育的调控作用。在成熟小鼠卵母细胞中检测到miR-30, miR-16, let-7和miR-17-92家族，其中let-7和miR-17-92家族是受精卵中发现最丰富的母系miRNA[32]，它们展示了卵子生发和早期胚胎发育的动态调控，且由受精卵遗传的miR-17-92 miRNA在卵子发生时表达增加，在2-细胞胚胎期后再次增加[11]。由此可见miR-17-92可能调控细胞活动影响卵泡的发育，miRNA作为在后转录水平调控基因表达的重要分子，直接或间接调控部分母源基因的表达，它可能对卵母细胞早期减数分裂起重要的作用。Murchison等首先研究小鼠卵母细胞miRNA表达，结果示miR-30、miR-16和let-7家族在小鼠GV期卵母细胞中高度表达，认为miRNA在卵泡成熟时对mRNA表达可能起重要的调控作用[32]。Dicer是miRNA合成过程中的必需物质，敲除卵母细胞的Dicer，导致卵母细胞减数分裂纺锤体结构的缺失和染色体凝集，以致卵母细胞失去减数分裂的能力，使卵泡生长、成熟、排卵障碍和不孕等[33-35]. miRNA基因芯片分析显示靶基因miR-103、miR-16、miR-30b、miR-30c和let-7d的表达在维持纺锤体结构的稳定起重要作用[36]。因此miRNA可能是通过调控卵母细胞的靶基因从而实现对染色体分离和减数分裂成熟的调节，但其调控机制及作用靶点有待进一步的研究。Landgraf等发现多种miRNA在人卵巢中表达，其中表达数量最多的十种miRNA分别是miR-143-3p、miR-125b、let-7b、let-7a、miR-16、miR-126、miR-99a、miR-26a、miR-29a、let-7c[37]. S. Assou等通过采用深度测序方法研究miRNA 在体外受精的妇女卵母细胞和卵丘细胞中的表达发现，在

MII 期卵母细胞中miR-184、miR-100 和miR-10A 高表达，而在卵丘细胞中

miR-29a、miR-30d、miR-21、miR-93、miR-320a、miR-125a和LET7家族呈现

81

高表达，且这些miRNA参与基因转录、细胞周期、卵母细胞的发育以及抗凋亡作用等[38]。Sang等在研究miRNA在人卵泡液中的表达时发现，表达数量最多的十四种miRNA依次为miR-483–5p、miR-574–3p、miR-518f、miR-191、miR-193b、miR-1274B、miR-320、miR-720、miR-520c-3p、miR-24、miR-132、miR-146a、miR-222和miR-1290[39]. Yang S等最近研究证实miRNA参与启动始基卵泡生长过程，该研究通过对比3日龄和5日龄新生小鼠卵巢miRNA表达谱发现有24种miRNA的表达呈现明显变化，进行通路富集分析发现其中表达上调的miRNA调节48条信号转导通路而表达下调的miRNA调节29条信号通路。该研究选择表达上调的miR-145作进一步分析，miR-145在初级卵泡颗粒细胞中大量表达，它可能在TGF-β信号通路中通过调控Tgfbr2、Acvr1b、Smad3和Smad5等靶基因而发挥作用，miR-145可通过直接靶向作用于Tgfbr2和下调TGF-β/Smad信号转导通路活性的方式抑制始基卵泡生长启动，采用miR-145拮抗剂（antagomir）下调miR-145的表达则可以明显降低始基卵泡的数目并增加生长卵泡的数目，可见miR-145 在抑制始基卵泡生长启动和维持始基卵泡池静止方面起着重要作用

[40] 。

细胞与细胞间的通讯在卵泡的发育生长过程中起重要的作用，外质体被认为参与调控作用。从牛的卵泡液分离出外质体和非外质体中，分别发现509和356种miRNA。其中有331种miRNA同时存在于外质体和非外质体中[41]。另外，在马卵泡液的微泡和外质体中分别发现了79和41种miRNA，而在颗粒细胞和卵丘细胞中也分别发现了22和35种miRNA[42]。卵母细胞周围的miRNA可能通过促进细胞间的通讯参与调节卵泡的发育和成熟。

2.4.2 miRNA对颗粒细胞的调控作用。

Fiedler等检测了LH-CGR激活前后小鼠颗粒细胞中miRNA的表达，共发现212种，其中有13种miRNA表达存在差异，10种下调，3种上调。在HCG刺激4h后，miR-132、miR-212和miR-21的表达明显上调。而miR-132作用于羧基末端结合蛋白1 (CtBPl)进行基因调控。另外环腺苷酸（cAMP）处理培养的颗粒细胞会增加miR-132和miR-212的表达水平，而miR-132和miR-212却能抑制CtBPl，但不改变mRNA的水平[43]。表明这些miRNA可能通过间接调节转录基因的表达影响卵巢颗粒细胞的功能，但调控机制以及其下游抑制物的识别

82

仍需要进一步的研究。在未成熟的小鼠中注射hCG 4h后，膜颗粒细胞中pri- miR-21的表达增加了30倍，而在成熟小鼠中注射hCG 6h后，miR-21增加最多可达5.8倍[44]。此外，将以miR-21为靶点的闭锁核酸(LNA)注入卵巢囊内，颗粒细胞的形态发生明显的改变。而在LH的作用下，miR-21表达上调，同时减少caspase 3的降解，另外敲除miR-21的卵巢中颗粒细胞凋亡增加以及排卵率下降[45]。可见miR-21可能通过后转录水平调节转录因子的表达，从而抑制排卵前颗粒细胞的凋亡，维持卵巢正常的生理功能。Zhang等报道了miR-181a在小鼠颗粒细胞中的调控作用，在activinA的作用下miR-181a表达下调，且具有时间和剂量的依赖性，而过表达的miR-181a通过与其靶基因acvr2a 3'UTR端特异性结合，下调细胞周期蛋白D2和PCNA的表达，从而抑制颗粒细胞的增殖。另外，过表达的miR-181a抑制活化素胞内信号传导分子Smad2磷酸化，导致活化素信号传导途径失活。因此miR-181a在颗粒细胞增殖过程中起重要的调控作用[46]。

Sirotkin等为了探索miRNA在人体卵巢颗粒细胞中的作用，将187种人工合成的内源性前体miRNA模拟物转染到原代培养的卵巢颗粒细胞中，发现miR-108、miR-7、miR-9、miR-105、miR-128、miR-132、miR-141、miR-142、miR-152、miR-188和miR-191等可显著增加细胞增殖标记物PCNA的表达，同时发现miR-15a、miR-96、miR-92、miR-124、miR-18、miR-29a、miR-125a、miR-136、miR-147、miR-183和miR-32等可增加促凋亡标记物Bax的表达[47]。Yang等在研究人卵巢颗粒细胞中miR-23a表达及作用时发现，miR-23a高表达可以增加卵巢颗粒细胞凋亡率[48]。综上研究显示miRNA通过调节其靶基因影响颗粒细胞的增殖、分化和凋亡。

2.4.3 miRNA与甾体激素的调控作用。

miRNA对卵巢类固醇激素生成具有调控作用。Sirotkin等在研究miRNA对卵巢细胞中甾体激素分泌的影响时发现，所检测的80 种miRNA 中有36 种

miRNA抑制人卵巢颗粒细胞孕激素的分泌，有10种miRNA可促进孕激素的分泌；同时发现有57种miRNA可抑制雄激素的分泌，只有miRNA-107可促进雄激素的分泌；该研究还发现有51种miRNA可促进雌激素的分泌，但未检测到可以促进雌激素分泌的miRNA。另外，该研究还发现mir-19a、mir-20、mir-27、mir-28、mir-29、mir-31、mir-105、mir-108、mir-125b、mir-126等对孕激素、

83

雌激素和雄激素的分泌均有抑制作用[47]。研究小鼠颗粒细胞发现，miR-224可以通过调控抑癌基因Smad4调控TGF-β信号通路，促进CYP19A1基因表达，影响小鼠窦前卵泡颗粒细胞17β-雌二醇的分泌[49]。另外抑癌基因p53和NF-κp65可能协同抑制miR-224宿主基因GABAA受体亚基启动子ε的表达，增强Smad4的表达，调控小鼠颗粒细胞增殖和雌二醇释放[50]。miR-378以性激素环化酶mRNA 3′-UTR为靶点直接降低颗粒细胞蛋白质水平及雌激素的分泌[51]。Yao等用FSH处理颗粒细胞12 h后发现，17个miRNA上调，14个下调，导致了孕酮分泌增加[52]。这揭示了miRNA在FSH调控颗粒细胞过程中可能具有重要调节作用，并和性激素分泌有关。

然而，性激素对miRNA的生成也具有调控作用。Yao等用FSH处理颗粒细胞12 h后发现，17种miRNA上调，14种下调，导致孕酮分泌增加[53]。这揭示了miRNA在FSH调控颗粒细胞过程中可能具有重要调节作用，并和性激素分泌有关。用LH/FSH小鼠颗粒细胞0h、4h后，微阵列分析其卵巢miRNA的表达谱，共发现212种，其中有13种miRNA表达存在差异，10种下调，3种上调。上调的miRNA中以miR-132和miR-212较显著。而miR-132作用于羧基末端结合蛋白1 (CtBPl)进行基因调控。miR-132和miR-212能抑制CtBPl，但不改变

mRNA的水平[54]。可见，miRNA广泛存在于卵巢组织中，可能参与调控对卵泡发生和内分泌具有重要作用的相关基因。FSH刺激雌激素和孕激素的产生，调节发情周期和繁殖。在大鼠卵巢hCG处理12h后，miR-29a和miR-30d表达明显下调，而在28 h后分别下降了50%和33%。提示这两个miRNA可能参与

FSH调控颗粒细胞的功能。此外，miR-30d可能是通过调控PCG家族成员RNF2和EED的表达来影响孕酮的合成[55]。体内LH峰诱导后的小鼠颗粒细胞miR-21b表达升高，升高的miR-21具有阻断颗粒细胞凋亡并在维持黄体功能中发挥重要作用[56]。最近Zhao等人研究黄体支持控制卵巢刺激对子宫内膜miRNA表达的影响。研究发现黄体中期孕激素支持组与无类固醇激素支持组相比，有33 种

miRNA表达上调，3种miRNA表达下调。而雌激素+孕激素支持组与孕激素支持组相比却有5种miRNA表达上调[57]。根据此研究，我们认为具有抗增殖作用的孕激素局限性地增加子宫内膜miRNA的表达，同时额外使用雌激素会减弱这种作用。此外控制卵巢激素的释放或者选择性的使用类固醇激素可能调节子宫内

膜 miRNA 的表达，从而影响子宫内膜容受性和胚胎着床率。从上述的研究证明

84

miRNA既可以调控性激素分泌，又可以受性激素的调节。这种双向调控作用在女性生殖道发育过程中至关重要。

2.4.3miRNA对卵巢癌的调控作用

卵巢肿瘤是女性生殖道三大恶性肿瘤之一，其中卵巢上皮癌是妇科癌症中死亡率最高的一种癌症。近年来miRNA异常的表达被证明参与卵巢癌的发生。Iorio等首先研究卵巢癌中miRNA的表达情况，结果发现在卵巢癌组织中miR-200a、miR-141、miR-200b和miR-200c的表达明显上调，而miR-199a、miR-140、miR-145和miR-125b则显著下调。miR-140在卵巢癌中缺失，基因位于染色体6q22，这个易碎区域在卵巢癌中常常缺失。miR-140可以通过调控靶基因影响多种细胞活动，包括肿瘤侵入和血管发生等。可见，这些miRNAs可能在卵巢癌的的病理发生和发展过程中发挥非常重要的作用。此外，在子宫内膜样卵巢瘤中miR-200a、miR-200b、miR-200c和miR-141表达显著上调，而miR-222和miR-144表达下调。在卵巢粘液性囊腺瘤中miR-212表达下调，其靶向作用于基因WT1和BRCA-1[58]。说明miRNA的表达可以区分不同组织亚型的卵巢癌，有助于及时明确诊断和有效地治疗。随后有研究证明miR-200a/b/c、miR-141和miR-429通过调控钙黏着蛋白E受体ZEB1、ZEB2和氧化应激途径p38a参与卵巢上皮癌的发生[59-60]. Silvia等人研究发现miR-200c可以增加RNA结合蛋白HuR和TUBB3

mRNA的结合，结合后增强TUBB3 mRNA翻译，更重要的是，还发现miR-200c过表达依赖于HuR在细胞上的位置，从而影响卵巢癌患者的预后。当HuR在核中时，高表达的miR-200c 抑制TUBB3 的表达，则卵巢癌预后良好。然而当

HuR在细胞浆时，高表达的miR-200c却增强TUBB3的表达，而且产生不良的后果。因此，研究miRNA的表达可能有利于预测卵巢癌患者的预后[61]。此外，miR-144、miR-16、miR-182、miR-18b、miR-19a、miR-106b和miR-223在三种不同病理组织分型的卵巢肿瘤均表达上调[62]。miR-148a在卵巢癌表达下调，从而通过异常调控细胞增殖参与卵巢癌病变[63]。

最近也有一系列的研究发现miRNA与卵巢肿瘤患者的生存和复发有密切的关系。最近Kristin等发现多种miRNA与卵巢癌患者的生存和复发有关，其中hsa-miR-521水平每增加一个单位，I/II期卵巢癌患者的死亡风险就会增加2.10倍，更高分期的肿瘤患者，miR-521 每增加一个单位，其死亡风险则减少0.55

85

倍。因此，miR-521的低表达可能与低级（I/II期）卵巢肿瘤最低生产率和高级

（II期以上）最高生存率有关，且依赖肿瘤分期影响患者的生存情况[64]。此外，miR-22在III/IV期的卵巢上皮癌表达下调，而在首次复发的浆液性乳头状卵巢癌表达上调；miR-16在浆液性卵巢癌和III/IV卵巢癌表达上调[65]。miR-214在卵巢癌瘤组织中表达上调，通过靶向作用于基因PTEN参与高度恶性和晚期肿瘤，复发的卵巢上皮癌组织中miR-214的表达上调。因此，推测miR-214可能在肿瘤复发过程中具有重要的调控作用[66-67]。综上发现，正常和病理状态下卵巢中有特定miRNA在组织的表达调控靶基因的表达，使得卵巢呈现正常或者病变。认识卵巢癌组织中miRNA及其靶基因异常表达，可能有利于癌症的准确诊断和治疗，然而调控miRNA表达途径或者调控物质还有待进一步研究。

**3. miRNA与PCOS的关系**

多囊卵巢综合征(Polycystic Ovary Syndrome, PCOS)是育龄期妇女最常见的生殖内分泌疾病，一种生殖功能障碍与糖代谢异常并存的内分泌紊乱综合征。主要以持续无排卵、雄激素分泌过多以及卵巢呈多囊改变为特征，育龄期女性的发病率为5-10%，是无排卵性不孕的主要原因。miRNA在甾体激素生成、卵泡成熟、早期胚胎发育及胰岛素抵抗等生理病理过程均发挥重要的调节作用[54]。利用辅助生殖技术从妇女体内获得颗粒、卵丘细胞，发现多囊卵巢综合征患者与正常卵子供给者之间的miR-23a、miR-23b、miR-542–3p、miR-211和miR-17–5p表达存在明显的差异，且这些miRNA的靶标基因COX-2、IL-1β、StAR、CYP-19A1和ERβE表达降低[68-69]。可见，miRNA可能对卵巢支持细胞特定基因产生直接调控作用，影响PCOS及其卵巢其它疾病相关的卵泡发育和颗粒细胞功能，不同卵巢疾病的miRNA的表达谱可呈现不同的特点[70]。

3.1. miRNA与PCOS患者甾体激素调节

越来越多的研究表明，miRNA参与调控PCOS患者卵巢中激素的合成与分泌。Yao等研究发现miR-224不仅参与TGF-β1介导的小鼠颗粒细胞增殖，而且还可以通过作用于靶目标Smad4促进卵巢颗粒细胞雌激素的分泌[49]。研究显示，miR-224在PCOS患者卵泡液中表达增加[35]。这表明miR-224可能在PCOS患者卵巢激素的调节过程中发挥着重要作用，但具体调控机制尚不清楚，有待进一步研究。Sang等研究miRNA在卵泡液中的作用时发现，人卵泡液中多种miRNA

86

与类固醇激素分泌和PCOS发病密切相关，且miR-24、miR-193b和miR-483-5p与孕激素浓度的调节有关，三者均可降低孕激素的分泌，miR-132、miR-320、miR-520c-3p、miR-24和miR-222参与调节雌激素浓度，其中miR-132、miR-320、miR-520c-3p和miR-222促进雌激素分泌，miR-24可以降低雌激素分泌；同时还发现PCOS患者与健康人相比卵泡液中miR-132和miR-320的表达水平明显降低，miR-132和miR-320两者低表达还可能会影响HMGA2和RAB5B基因表达，HMGA2和RAB5B与PCOS的发生密切相关[39]。

现有研究表明，miRNA在卵巢细胞甾体激素调节过程中起着重要作用，在

PCOS等疾病状态下miRNA表达异常，从而影响卵巢甾体激素的合成与分泌。但是miRNA在PCOS疾病状态下调控甾体激素合成分泌的具体机制如何，通过影响哪些基因的表达以及这些基因又如何发挥作用，这些问题尚待更深入研究。

**3.2 miRNA与PCOS患者高雄激素血症**

高雄激素血症是PCOS患者常见的临床特征，表现为血循环中雄激素主要包括睾酮、雄烯二酮和双氢睾酮等水平升高。PCOS患者卵巢内雄激素过多可通过诱导卵母细胞FoxO3a易位导致早期卵泡过多，并可通过下调生长分化因子-9的表达引起卵泡发育停滞[71]。既往研究证实FOXO3a是miR-96的靶目标之一，可促进癌细胞的增殖[72]。PCOS患者卵巢中miR-96的表达显著下调，并且主要存在于囊性卵泡的卵泡膜和卵丘颗粒细胞中，而研究也表明在高雄激素血症条件下窦前卵泡中的细胞增殖主要由miR-96介导调控[72]。通过双氢睾酮（DTH）诱导的大鼠PCOS模型实验研究发现，在高雄激素血症条件下卵巢中多种miRNA的表达存在差异，通过对349种miRNA的表达进行分析，其中有17种miRNA 在

DHT处理组中表达显著下调，另有72种miRNA在DHT处理组中表达显著上调，且这些miRNA可能通过雄激素、醛固酮、血管内皮生长因子、纤维细胞生长因子、生长激素、雌激素受体、G蛋白偶联受体、糖皮质激素受体以及雄激素和雌激素代谢信号途径参与卵巢功能障碍的调控作用。另外用原位定位的方法比较

DHT大鼠和对照组中不同表达的miRNA在不同卵泡阶段的特异性调控。发现这些miRNA主要位于DHT大鼠卵泡膜细胞上。在窦卵泡膜上rno-miR-96、rno-miR-31和rno-miR-222特异性表达，rno-miR-24和rno-miR-183高度表达，而在窦卵泡的颗粒细胞中表达则很少[73]。最近一项研究显示，在PCOS患者体

87

内循环miRNA的表达受肥胖和血清游离睾酮水平的影响[74]。由此可见，miRNA的表达与雄激素水平之间存在着密切联系。

另有研究显示雄激素在卵泡发育和生育能力方面起着关键作用，雄激素可以增强miR-125b的表达，且miR-125b靶向作用于抗凋亡蛋白抑制卵泡闭锁，小鼠体内低剂量外源性雄激素促进促性腺激素诱导排卵，有利于提高卵巢储备功能降低患者的排卵率；既往研究已证实卵泡闭锁和卵泡发育之间的平衡对于维持卵巢正常功能是必需的，雄激素在维护这个平衡中发挥着重要作用，雄激素过多破坏该平衡，可能是PCOS发生发展的重要因素之一，miR-125b参与PCOS的分子生物学机制尚需进一步研究[75]。

上述研究表明，miRNA参与雄激素调节卵泡发育的过程，PCOS高雄激素血症状态下miRNA的表达可呈现不同的变化，但其相关基因调控网络和作用通路尚不完全清楚。

**3.3 miRNA与PCOS患者胰岛素抵抗**

胰岛素抵抗(IR)及高胰岛素血症是多囊卵巢综合征(PCOS)患者代谢异常的基本特征，也是PCOS 患者内分泌代谢紊乱的主要特征之一。大约44-70%的

PCOS患者伴发胰岛素抵抗，肥胖的PCOS患者更容易发生胰岛素抵抗，而一些偏瘦的PCOS患者体内胰岛素敏感性可以是正常的[76-77]. miRNA参与调控代谢性疾病的基因调控，包括2型糖尿病和胰岛素抵抗。应用microRNA微阵列芯片技术，证明了胰岛素抵抗较非胰岛素抵抗的脂肪细胞中有50多个miRNA的表达量升高和29个miRNA的表达降低，而调节糖代谢的主要信号通路是胰岛素受体介导的PI3-K途径，此信号机制的异常会导致胰岛素抵抗的发生。从此结果可以推测miRNA可能通过影响细胞胰岛素PI3-K的信号传导通路而导致胰岛素抵抗[78]。另外He A等研究2型糖尿病的Goto-Kakizaki大鼠与对照组相比，miR-29、miR-29a、miR-29b和miR-29c的表达下调。过表达的miR-29家族靶向作用于INSIG1和CAV2，导致胰岛素抵抗[79]。近年研究表明，miR-7、miR-9、miR-21、miR-29a/b/c、miR-30d、miR-124a、miR-338-3p和miR-375等在维持胰腺β细胞功能及调节胰岛素分泌方面起着重要的作用[80]。研究还发现miR-143、miR-29 a/b/c和miR-320等参与脂肪组织中胰岛素敏感性的调节，三种miRNA

88

过表达可降低胰岛素敏感性而导致胰岛素抵抗的发生[80]。可见，miRNA表达异常和功能失调在PCOS患者胰岛素抵抗的发生发展中起着重要作用。

最近研究发现miR-93在PCOS患者脂肪组织中高表达，miR-93可通过直接靶向作用于GLUT4 3′UTR下调GLUT4的表达，脂肪细胞中GLUT4表达的减少可能是PCOS患者胰岛素抵抗的重要原因；研究还显示miR-133和miR-223 在

PCOS伴胰岛素抵抗患者中同样高表达[81]。在心肌细胞中miR-133可以通过靶向作用于KLF15调控GLUT4的表达，miR-133高表达可以降低KLF15蛋白表达水平，从而减少下游靶目标GLUT4的表达；心肌细胞中miR-223的高表达可以上调GLUT4的表达并可以促进葡萄糖的摄取[82-83]。因此，miR-133和miR-223可能在PCOS伴胰岛素抵抗中发挥着不同的作用。最近，研究者采用miRNA芯片分析PCOS患者血清中miRNAs的表达水平，结果显示在PCOS患者血清中，有8个miRNA表达上调，分别是miR-16、miR-19a、miR-106b、miR-30c、miR-146a、miR-24、miR-186 和miR-222，只有miR-320表达下调。此外，miR-222的表达水平与PCOS患者中血清胰岛素水平密切相关[84]，既往也有研究显示miR-222与2型糖尿病和妊娠糖尿病密切相关[85-86]。

**3.4 miRNA与PCOS患者不孕症**

PCOS患者受孕能力明显降低，大约40%的患者伴有不孕症，PCOS已成为无排卵性不孕症的最常见原因，大约90%-95%的无排卵不孕症妇女临床上常患有PCOS[87-88]。

研究已表明，miRNA在卵泡发育和卵巢功能调控方面发挥着重要作用[89]。既往对PCOS 患者及具有正常生育能力女性的卵母细胞转录谱比较分析发现，

miRNA通过作用于多种靶基因发挥其调控功能；研究还发现患有不孕症妇女与正常女性组相比，卵巢颗粒细胞和卵丘细胞中miR-211、miR-17-5p、miR-542-3p、miR-23a、miR-23b等多种miRNA的表达明显不同，它们可以通过靶向作用于IL-1β、StAR、COX-2和CYP-19A1等多种因子而发挥调控卵泡发育和成熟的作用[90]。此外，雄激素不仅仅是雌激素合成的前体，过去研究已证实PCOS患者生育能力降低与体内雄激素过多密切相关，而近年研究表明雄激素受体敲除

（ARKO）的雌性小鼠有生育能力低下、卵泡发育不良、排卵数减少和卵巢早衰等生殖缺陷的表现，之后通过颗粒细胞特异性ARKO雌性小鼠模型证实，雄激素

89

是通过减少卵泡闭锁和促进窦前卵泡生长发育为窦卵泡等方式调节卵泡发育及女性生育能力的[75]。进一步研究发现，雄激素可通过上调FSH受体和miR-125b的表达来调控卵巢卵泡发育，miR-125b可靶向作用于抗凋亡蛋白而抑制卵泡闭锁[75]。以上研究表明，miRNA参与卵巢卵泡发育和卵泡闭锁过程，卵巢内miRNA的紊乱表达可引起卵巢卵泡发育障碍而导致女性生育能力下降或不孕，这对我们进一步研究PCOS疾病的发生发展机制具有重要意义。

越来越多的研究证实，PCOS患者卵巢卵泡液中miRNA表达紊乱可能与不孕症有关。Sang等研究发现，与因男方不育而采用体外受精的妇女相比，PCOS患者卵泡液中miR-132和miR-320的表达明显降低[39]。最近一项研究通过比较接受体外受精的PCOS患者与接受赠卵者的卵泡液中miRNA的表达，发现有29种miRNA 在两组间表达不同，其中miRNA32、miRNA34c、miRNA135a、

miRNA18a和miRNA9等五种miRNA的表达在PCOS组中呈显著增加[79]；研究还发现较之对照组，IRS2、SYT1和IL8等作为miRNA潜在靶基因在PCOS组呈现明显低表达，miRNA可能对这些靶基因起着抑制作用，其中小鼠缺乏IRS2除可以引起胰岛素抵抗外，还可以导致发情周期紊乱、排卵障碍和不孕不育[79]。

**4.总结：**

miRNA在女性生殖道卵巢、子宫、输卵管、卵泡以及胚胎发育过程中广泛表达。miRNA通过与其靶基因特异性结合，引起靶标mRNA降解或者抑制其翻译，在后转录水平调控生殖系统器官的发育。miRNA与PCOS患者甾体激素调节、胰岛素抵抗、高雄激素血症和不孕症关系密切，但分子调控机制尚待深入研究。目前对女性生殖道miRNA调控作用的认识仍有限，针对女性生殖道中特定的miRNA，明确miRNA与PCOS的关系，有助于我们进一步了解PCOS的病因及发病机制，在分子水平上加深对生殖道器官生理和病变机制的认识，为生殖系统疾病的诊断和治疗提供新的靶点，也为防治不孕不育提供新的药物靶点。

参考文献：

[1]. Nicolas J. Lehrbach, Cecilia Castro, et al. Post-developmental microRNA expression is required for normal signaling physiology, and regulates aging in parallel to insulin/IGF-1 in C. elegans[J]. RNA. 2012; 18: 2220-2235.90

[2]. Martin D. Jansson, Anders H. Lund. MicroRNA and cancer[J]. molecular oncology. 2012; 590e610

[3]. Williams AH, Liu N, van Rooij E, et al. MicroRNA control of muscle development and disease[J]. Curr Opin Cell Biol. 2009, 21: 461-469

[4]. Hwang HW, Mendell JT. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis[J]. Br J Cancer 2007, 96(Suppl): R40-44

[5]. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]． Cell.

2004; 116( 2): 281-297．

[6]. Leigh-Ann, MacFarlane, Paul R. Murphy. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer[J]. Current Genomics, 2010; 11, 537-561

[7]. Berezikov E, Chung WJ, Willis J, et al. Mammalian mirtron genes[J]. Mol Cell. 2007; 28: 328–336.

[8]. van Rooij E, Olson EN. MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets[J]. J Clin Invest 2007; 117: 2369–2376.

[9]. Schwartz JC, Younger ST, Nguyen NB, et al. Antisense transcripts are targets for activating small RNAs[J]. Nat Struct Mol Biol. 2008; 15: 842–848.

[10]. Martin D. Jansson, Anders H. Lund. MicroRNA and cancer[J]. molecular oncology. 2012; 590e610

[11]. Tang F, Kaneda M, O'Carroll D, et al. Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development. Genes Dev. 2007; 21: 644–648.

[12]. Pang RTK, Liu W-M, Leung CON,, et al. miR-135A Regulates Preimplantation Embryo Development through Down-Regulation f E3 Ubiquitin Ligase Seven in Absentia Homolog 1A (SIAH1A) Expression[J]. PLoS ONE. 2011; 6(11): oe27878.

[13]. Xia HF, Jin XH, Cao ZF et al. MiR-98 is involved in rat embryo implantation by targeting Bcl-xl[J]. FEBS Lett. 2014; 14; 588(4): 574-83.

[14]. Xia HF, Jin XH, Cao ZF, et al. MicroRNA expression and regulation in the uterus during embryo implantation in rat[J]. FEBS J. 2014; 281(7): 1872-9191

[15]. Hong X, Luense LJ, McGinnis LK, et al. Dicer1 is essential for female fertility and normal development of the female reproductive system[J]. Endocrinology. 2008; 149(12): 6207-6212.

[16]. Nothnick WB, Healy C, et al. Estrogen induces distinct patterns of microRNA expression within the mouse uterus[J]. Reproductive Sciences. 2010; 17(11): 987-994.

[17]. Nothnick WB, Healy C, Hong X. Steroidal regulation of uterine miRNAs is associated with modulation of the miRNA biogenesis components Exportin-5 and Dicer1[J]. Endocrine. 2010; 37(2): 265-273.

[18]. Estella C, Herrer I, Moreno-Moya JM,, et al. miRNA Signature and Dicer Requirement during Human Endometrial Stromal Decidualization In Vitro[J]. PLoS ONE. 2012; 7(7): e41080.

[19]. Pan Q, Luo X, To loubeydokhti T, et al. The expression profile of micro-RNA in endometrium and endometriosis and the influence of ovarian steroids on their expression[J]. Molecular Human Reproduction. 2007; 13797–806.

[20]. Toloubeydokhti T, Pan Q, Luo X, et al. The expression and ovarian steroid regulationofendometrialmicro-RNAs[J]. Reproductive Sciences. 2008; 15993–1001

[21]. Liu X, Gao R, Chen X, et al. Possible Roles of mmu-miR-141 in the Endometrium of Mice in Early Pregnancy Following Embryo Implantation[J]. PLoS One. 2013; 8(6): e67382.

[22]. Zhang R, He Y, Zhang X, et al. Estrogenreceptor-regulated microRNAs contribute to the BCL2/BAX imbalance in endometrial adenocarcinoma and precancerous lesions[J]. Cancer Letters 2012; 314 155–165

[23]. Snowdon J, Zhang X, Childs T, et al, Feilotter H. The microRNAs-200 family is upregulated in endometrial carcinoma[J]. PLoS ONE. 2011; 6e22828.

[24]. Lee JW, Park YA, Choi JJ,, et al. The expression of the miRNA-200 family in endometrial endometrioid carcinoma[J]. Gynecologic Oncology. 2011; 120 56–62.92

[25]. Park YA, Lee JW, C hoi JJ,, et al. The interactions between microRNA-200c and BRD7 in endometrial carcinoma[J]. Gynecolog ic Oncology. 2012; 124 125–133.

[26]. Myatt SS, Wang J, Monteiro LJ,, et al. Definition of microRNAs that repress expression of the tumor suppressor gene FOXO1 in endometrial cancer[J]. Cancer Research. 2010; 70367–377.

[27]. Chung TK, Lau TS, Cheung TH,, et al. Dysregulation of microRNAs-204 mediates migration and invasion of endometrial cancer by regulating FOXC1[J]. International Journal of Cancer. 2012; 130 1036–1045.

[28]. Renthal N E, Chen CC, Williams KC, et al. miR-200 family and targets ZEB1 and ZEB2, modulate uterine quiescence and contractility during pregnancy and labor[J]. PNAS. 2010; 107 20828–20833.

[29]. Zavadil J, Ye H, Liu Z, et al. Profiling and functional analyses of microRNAs and their target gene products in human uterine leiomyomas[J]. PLoS ONE. 2010; 5e12362.

[30]. Hassan SS, Romero R, Pineles B,, et al. MicroRNA expression profiling of the human uterine cervix after term labor and delivery[J]. American Journal of Obstetrics and Gynecology. 2010; 202, 80e1–80e8.

[31]. Nagaraja AK, Andreu-Vieyra C, Franco HL, et al. Deletion of Dicer in somatic cells of the female reproductive tract causes sterility[J]. Molecular Endocrinology. 2008; 22, 2336–2352.

[32]. Murchison EP, Stein P, Xuan Z,, et al. Critical roles for Dicer in the female germline[J]. Genes Dev. 2007; 21(6): 682–93.

[33]. Lacey J. Luense, Martha Z. Carletti, et al. Role of Dicer in Female Fertility[J]. Trends Endocrinol Metab. 2009; 20(6): 265–272.

[34]. 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: 1944-54．93

[35]. Lei Lei, Shiying Jin, Gabriel Gonzalez, et al． The regulatory role of Dicer in folliculogenesis in mice[J]. Mol Cell Endocrinol. 2010 February 5; 315(1-2): 63.

[36]. Nayoung Suh, Lauren Baehner, Felix Moltzahn, et al. MicroRNA Function Is Globally Suppressed in Mouse Oocytes and Early Embryos[J]. Curr Biol. 2010; 20(3): 271–277

[37]. Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing[J]. Cell, 2007, 129(7): 1401-1414.

[38]. Assou S, Al-Edani T, Haouzi D, et al. MicroRNAs: new candidates for the regulation of the human cumulus-oocyte complex[J]. Hum Reprod, 2013, 28(11): 3038-3049.

[39]. 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.

[40]. Yang S, Wang S, Luo A, et al. Expression patterns and regulatory functions of microRNAs during the initiation of primordial follicle development in the neonatal mouse ovary[J]. Biology of Reproduction 2013, 27; 89(5): 126.

[41]. Sohel MMH, Hoelker M, Noferesti SS,, et al. (2013) Exosomal and non-exosomal transport of extra-cellular microRNAs in follicular fluid: implications for bovine oocyte developmental competence[J]. PLoS One., 8: e78505.

[42]. Da Silveira JC, Veeramachaneni DN, Winger QA, et al. Cell-secreted vesicles in equine ovarian follicular fluid contain miRNAs and proteins: A possible new form of cell communication within the ovarian follicle[J]. Biol Reprod. 2012, 86: 71.

[43]. Fiedler SD, Carletti MZ, Hong X, et al. Hormonal regulation of MicroRNA expression in periovulatory mouse mural granulosa cells[J]. Biol Reprod. 2008; 79( 6): 1030-1037．

94

[44]. Kim YJ, Ku SY, Kim YY, et, al. MicroRNAs transfected into granulosa cells may regulate oocyte meiotic competence duringin vitro maturation of mouse follicles[J]. Human Reproduction. 2013; 28: 11, 3050–3061

[45]. Carletti MZ, Fiedler SD, Christenson LK. MicroRNA 21 blocks apoptosis in mouse periovulatory granulosa cells [J]. Biol Reprod. 2010, 83(2): 286-295.

[46]. Zhang Q, Sun H, Jiang Y, Ding L, et al. MicroRNA-181a Suppresses Mouse Granulosa Cell Proliferation by Targeting Activin Receptor IIA[J]. PLOS ONE. 2013, 8(3): e59667.

[47]. Sirotkin A V, Laukova M, Ovcharenko D, et al. Identification of microRNAs controlling human ovarian cell proliferation and apoptosis[J]. J Cell Physiol, 2010, 223(1): 49-56.

[48]. 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.

[49]. Yao G, Yin M, Lian J, et al. MicroRNA-224 is involved in transforming growth factor-beta-mediated mouse granulosa cell proliferation and granulosa cell function by targeting Smad4[J]. Mol Endocrinol. 2010; 24( 3): 540-551．

[50]. Liang M, Yao G, Yin M, et al． Transcriptional cooperation between p53 andNF-κB p65 regulates microRNA-224 transcription in mouse ovarian granulosa cells[J]. Mol Cell Endocrinol. 2013, 370(1-2): 119-129

[51]. Xu S, Linher-Melville K, Yang BB, et al． MicroRNA-378 ( miR-378) regulates ovarian estradiol production by targeting aromatase[J]. Endocrinology, 2011, 152( 10): 3941-3951．

[52]. N. Yao, C. L. Lu, J. J. Zhao, et al, A network of miRNAs expressed in the ovary are regulated by FSH[J]. Front Biosci. 2009; 14,

[53]. Nan Yao, Bai-Qing Yang, Yu Liu, et al． Follicle-stimulating hormoneregulation of microRNA expression on progesterone production in cultured rat granulosa cells[J]. Endocr. 2010; 38: 158–166

95

[54]. Fiedler SD, Carletti MZ, Hong X, et al. Hormonal regulation of MicroRNA expression in periovulatory mouse mural granulosa cells[J]. Biol Reprod. 2008; 79( 6): 1030-1037．

[55]. Nan Yao, Bai-Qing Yang, Yu Liu,, et al. Follicle-stimulating hormone regulation of microRNA expression on progesterone production in cultured rat granulosa cells[J]. Endocr. 2010; 38: 158–166

[56]. Carletti MZ, Fiedler SD, Christenson LK. MicroRNA 21 blocks apoptosis in mouse periovulatory granulosa cells [J]. Biol Reprod. 2010; 83(2): 286-295.

[57]. Yulian Zhao, Howard Zacur, Chris Cheadle, et al. Effect of luteal-phase support on endometrial microRNA expression following controlled ovarian stimulation[J]. Reproductive Biology and Endocrinology. 2012; 10: 72

[58]. Iorio MV, Visone R, Di Leva G, et al. MicroRNA signatures in human ovarian cancer[J]. Cancer Res. 2007; 67: 8699–8707.

[59]. Bendoraite A, Knouf EC, G arg KS, et al. Regulation of miR-200 family microRNAs and ZEB transcription factors in ovarian cancer: evidence supporting a mesothelial-to-epithelial translation[J]. Gynecologic Oncology. 2010; 116 117–125

[60]. Mateescu B, Batista L, Cardon M, et al. Sastre-Garau X, et al. miR-141 and miR-200a act on ovarian tumorigenesis by controlling oxidative stress response[J]. Nature Medicine. 2011; 171627–1635.

[61]. Silvia Prislei, Enrica Martinelli, Marisa Mariani, et al. MiR-200c and HuR inovarian cancer[J]. BMC Cancer. 2013; 13: 72

[62]. Wyman SK, Parkin RK, Mitchell PS, et al. Repertoire of microRNAs in epithelial ovarian cancer as determined by nextgeneration sequencing of small RNA cDNA libraries[J]. PLoS One. 2009; 4(4): e5311.

[63]. Zhou X, Zhao F, Wang ZN, et al. Alteredexpression of miR-152 and miR-148a in ovarian cancer is related to cell proliferation[J]. Oncol Rep. 2012; 27(2): 447–454.96

[64]. Delfino KR, Rodriguez-Zas SL. Transcription Factor-MicroRNA-Target Gene Networks Associated with Ovarian Cancer Survival andRecurrence[J]. PLoS ONE. 2013; 8(3): e58608.

[65]. Dahiya N, Morin PJ. MicroRNAs in ovarian carcinomas[J]. Endocr Relat Cancer. 2010; 17(1): F77–F89.

[66]. Yang H, Kong W, He L, et al. MicroRNAexpression profiling in human ovarian cancer: miR-214 induces cell survival andcisplatin resistance by targeting PTEN[J]. Cancer Res. 2008; 68(2): 425–433

[67]. Marchini S, Cavalieri D, Fruscio R, et al. Association between miR-200c and the survival of patients with stage I epithelial ovarian cancer: A retrospective study of two independent tumour tissue collections[J]. Lancet Oncol. 2011; 12(3): 273–285.

[68]. Alford C, Toloubeydokhti T, lkatanani Y, et a1． The expression ofmicroRNA(miRNA) mir-23a and 23b and their target gene, CYPl 9A1(aromatase) in follicular cells obtained from women undergoing ART[J]. Fertil Steril. 2007; 88: 1 66-167.

[69]. ToloubeyDokhti T, Alford C, Alkatanani Y, et a1. The expression of microRNA(miRNA), mir-17, mir-211 and mir-542 and their target genes, StAR, IL-lb and Cox2 in follicular cells derivedfrom women undergoing art[J]. Fertil Steril, 2007, 88: 165-166.

[70]. Roth L W, 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.

[71]. Yang J L, Zhang C P, Li L, et al. Testosterone induces redistribution of forkhead box-3a and down-regulation of growth and differentiation factor 9 messenger ribonucleic acid expression at early stage of mouse folliculogenesis[J]. Endocrinology, 2010, 151(2): 774-782.

97

[72]. Lin H, Dai T, Xiong H, et al. Unregulated miR-96 induces cell proliferation in human breast cancer by downregulating transcriptional factor FOXO3a[J]. PLoS One, 2010, 5(12): e15797.

[73]. Hossain M M, 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.

[74]. 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.

[75]. 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.

[76]. Diamanti-Kandarakis E, Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome revisited: an update on mechanisms and implications[J]. Endocr Rev, 2012, 33(6): 981-1030.

[77]. Tepavcevic S, Vojnovic M D, Macut D, et al. Dihydrotestosterone deteriorates cardiac insulin signaling and glucose transport in the rat model of polycystic ovary syndrome[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2014, 141C: 71-76.

[78]. He A, Zhu L, Gupta N, et al. Overexpression of micro ribonucleic acid 29, highly up-regulated in diabetic rats, leads to insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes[J]. Mol Endocrinol. 2007; 21: 2785–2794.

[79]. Hong-Yan Ling, He-Sheng Ou et al. Changes in microRNA profile and effects of mir-320 in insulin resistant 3T3-L1 adipocytes 2. Clinical and Experimental [J]. Pharmacology and Physiology. 2009, 36: e32–e39ne0gl

[80]. Mao Y, Mohan R, Zhang S, et al. MicroRNAs as pharmacological targets in diabetes[J]. Pharmacol Res, 2013, 75: 37-47.

98

[81]. Chen Y H, Heneidi S, Lee J M, 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.

[82]. Horie T, Ono K, Nishi H, et al. MicroRNA-133 regulates the expression of GLUT4 by targeting KLF15 and is involved in metabolic control in cardiac myocytes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 389(2): 315-320.

[83]. Lu H, Buchan R J, Cook S A. MicroRNA-223 regulates Glut4 expression and cardiomyocyte glucose metabolism[J]. Cardiovasc Res, 2010, 86(3): 410-420.

[84]. Long W, Zhao C, Ji C, et al. Characterization of serum microRNAs profile of PCOS and identification of novel non-invasive biomarkers. Cell[J]. Physiol. Biochem. 2014, 33, 1304–1315.

[85]. Ortega FJ, Mercader JM, Moreno-Navarrete JM et al. Profiling of circulating microRNAs reveals common micrornas linked to type 2 diabetes that change with insulin sensitization[J]. Diabetes Care 2014, 37, 1–9.

[86]. Shi Z., Zhao C, Guo X. et al. Differential expression of microRNAs in omental adipose tissue from gestational diabetes mellitus subjects reveals miR-222 as a regulator of ER expression in estrogen-induced insulin resistance[J]. Endocrinology 2014, doi: 10.1210/en. 2013-2046.

[87]. Koivunen R, Pouta A, Franks S, et al. Fecundability and spontaneous abortions in women with self-reported oligo-amenorrhea and/or hirsutism: Northern Finland Birth Cohort 1966 Study[J]. Hum Reprod, 2008, 23(9): 2134-2139.

[88]. Sirmans S M, Pate K A. Epidemiology, diagnosis, and management of polycystic ovary syndrome[J]. Clin Epidemiol, 2013, 6: 1-13.

[89]. Baley J, Li J. MicroRNAs and ovarian function[J]. J Ovarian Res, 2012, 5: 8.

[90]. Toloubeydokhti T, Bukulmez O, Chegini N. Potential regulatory functions of microRNAs in the ovary[J]. Semin Reprod Med, 2008, 26(6): 469-478.

99

**学术成果目录**

[1]. **Xiao G(肖国宏）**, Xia C, Yang J, Liu J, Tang SS(唐圣松, 通讯作者）, et al. MiR-133b regulates the expression of the actin protein TAGLN2 during oocyte growth and maturation: a potential target for infertility therapy. **[J]**. PLOS ONE． 2014 9(6) e100751

[2]. Hanzhen Xiong, Shaoyan Liu, Fang Wang, Zhongtang Xiong, Juan Chen, **Guohong Xiao**( 通讯作者). Integrated microRNA and mRNA Transcriptome Sequencing Reveals the Potential Roles of miRNAs in Stage I Endometrioid Endometrial Carcinoma. **[J]**. PLOS ONE． 2014 10(7 ) e110163

**[3].** JieYang, Ting Zhong, **GuohongXiao**(通讯作者), et al. The Polymorphisms and Haplotypes of TGF-β1 Gene are Associated with the Risk of PCOS in Chinese HanWomen Yan. [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. **(Accept)** 4. **肖国宏**, 夏承来, 林玉仪, 杨洁\*, 官蓉花, 刘见桥, 杜红姿, 康祥锦. MiR-133b 靶

[向] 转胶蛋白2基因调控卵泡发育的初步研究. **南方医科大学学报（已接收）**

[5]. **肖国宏**, 叶球仙, 杨洁**\***, 陈盛强, 孙卫文, 黄晓虹, 甘婷.. FMR1基因敲除对雌性小鼠生殖功能的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2014, 24(4): 7-11

[6] 黄晓虹,, **肖国宏**, 杨洁. 卵巢低反应的进展. 实用医学杂志[J]. 2013, 29(14): 2397-2399.

[7]. **肖国宏**, 侯棚钟, 陈敦金, 等. 干预协同刺激分子CD86 对生殖道沙眼衣原体感染小

鼠妊娠结局的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2012, 21(35): 4400-4404

8. 杨智莺, **肖国宏**, 侯棚钟等. 米非司酮诱导大鼠PCOS 动物模型的实验研究[J]. 现代

[妇] 产科进展, 2011, 20(8): 637-640

[9]. 黄晓虹, 杨洁, **肖国宏\***, 刘见桥, 杜红姿, 张伟良, 华七妹. 不同种类黄体生成素的应用对辅助生殖结局的影响[J]. 广州医学院学报, 2011, 41(5): 17-19

[10]. **肖国宏**, 孙利华, 陈敦金, 等. 阿奇霉素治疗沙眼衣原体感染孕鼠对其妊娠结局及免疫状态的影响[J]. 现代妇产科进展, 2010 (2): 87-91

[11]. 孙利华, **肖国宏**, 陈敦金, 等. 沙眼衣原体F 血清型感染孕鼠导致不良妊娠结局的初步研究[J]. 中华围产医学杂志, 2010 (4): 331-333.

[12]. 《宫腔微创技术质量月经过多的规范化系列研究》获2013年广东省科技进步二等奖（第二完成人）

100

致**谢**

在课题完成之际，回首这几年走过的路，有傍徨和坚持，有感悟和启迪，有欣喜和惆怅，但更多的是感激之情！

首先特别要感谢恩师唐圣松教授！感谢他这几年来的亲切关怀、谆谆教诲！感谢他在课题研究和论文撰写中所给予的辛勤指导和巨大帮助！更要感谢他对我在学术上的支持、鼓励和宽容！导师的科学精神、严谨学风和敏锐的学术洞见让我终生受益！

感谢南华大学病理和病理生理学研究所老师们的帮助；感谢广州医学大学附属第三医院同事在我学习期间给予我的帮助和理解，此外，感谢我家人的极力帮助，是他们的理解、支持、关心和鼓励，才使我学业顺利完成。

最后，感谢南华大学对我的培养和教育。我觉得自己不仅仅在业务上开阔了眼界、学习了技术、拓展了思路，再次感谢所有帮助和关心我的人！

101

**附 件**



102



103



104



105



106



107



108



109