

# 卵泡液内细胞来源外泌体 microRNAs 的分析及功能探究

王洁<sup>1</sup>, 崔趁趁<sup>2</sup>, 梁琳琳<sup>2</sup>, 王倩<sup>2</sup>, 李东晗<sup>2</sup>, 张富青<sup>1</sup>, 张翠莲<sup>2\*</sup>

基金项目: 国家自然科学基金联合基金项目(项目编号: U2004130); 河南省医学科技攻关计划项目(项目编号: LHGJ20220048)

作者单位: 453000 河南 郑州, 1. 郑州市妇幼保健院生殖遗传科; 2. 河南省人民医院生殖医学中心

作者简介: 王洁, 毕业于郑州大学人民医院, 硕士研究生, 住院医师, 主要研究方向为生殖遗传

\* 通信作者, E-mail: luckyzel@qq.com

**【摘要】目的** 分析正常女性仅在卵泡液中特异性表达的 microRNAs (miRNAs) 的功能及可能的代谢途径。**方法** 选取 2017 年 9 月至 2018 年 3 月于河南省人民医院生殖医学中心因单纯输卵管因素不孕就诊的患者 30 例, 于取卵日当天收取第一管清亮无血液污染的卵泡液, 提取、纯化卵泡液外泌体, 作为实验组; 同时于取卵日当天早晨抽取入组患者外周血, 提取、纯化血清外泌体, 作为对照组。提取纯化外泌体 miRNA, 采用 miRNA 芯片检测技术分析两组外泌体 miRNAs 的表达谱, 筛选出卵泡液中特有的 miRNAs, 生物信息学技术分析卵泡液中特有的 miRNAs 的功能及可能参与的调控通路。**结果** 卵泡液特异性外泌体 miRNAs 的靶基因主要富集 40 种信号通路, 其中一些信号通路与卵子发育密切相关, 如 MAPK 信号通路、胰岛素信号通路、TGF- $\beta$ 、PI3K-Akt 信号通路等; 且对 MAPK、TGF- $\beta$  信号的靶基因进行 PPI 网络互作分析, 筛选出与 MAPK 信号通路关联度较高的靶基因有 FGFR1、KRAS、BDNF、BRAF、EGFR、IGF1R, 与 TGF- $\beta$  信号通路关联度较高的靶基因有 SMAD2、ACVR1、BMP4、SMAD4、TGFB1。 **结论** 本研究表明卵泡液特异性外泌体 miRNAs 可能在调控卵子成熟、颗粒细胞增殖凋亡以及类固醇激素形成等方面发挥至关重要的作用。

**【关键词】** 卵泡液; 外泌体 microRNAs; miRNA 芯片分析; 生物信息学分析

**【中图分类号】** R 34 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1674-4020(2024)01-093-04

doi: 10.3969/j.issn.1674-4020.2024.01.25

## Analysis and functional exploration of cell-derived exosome microRNAs in follicular fluid

Wang Jie<sup>1</sup>, Cui Chenchen<sup>2</sup>, Liang Linlin<sup>2</sup>, Wang Qian<sup>2</sup>, Li Donghan<sup>2</sup>, Zhang Fuqing<sup>1</sup>, Zhang Cuilian<sup>2\*</sup>

1. Department of Reproductive Genetics, Zhengzhou Maternal and Child Health Hospital; 2. Reproductive Medicine Center, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou Henan 453000, P. R. China

\* Corresponding author, E-mail: luckyzel@qq.com

**【Abstract】Objective** To analyze the function and possible metabolic pathways of microRNAs (miRNAs) specifically expressed in follicular fluid in normal women. **Methods** From September 2017 to March 2018, 30 patients with infertility due to simple tubal factors were selected from the Reproductive Medicine Center of Henan Provincial People's Hospital. The first tube of clear and blood-free follicular fluid was collected on the day of oocyte retrieval, and the exosomes of follicular fluid were extracted and purified as the experimental group. Meanwhile, peripheral blood of the enrolled patients was obtained to extract and purify the exosome as control groups. And then, the extracted exosomal miRNA in the two groups were detected using miRNA microarray analysis, and the specific miRNAs in follicular fluid were screened out. Bioinformatics technology was used to analyze the functions of the specific miRNAs in follicular fluid and the possible regulatory pathways involved. **Results** The target genes of follicle-specific exosome miRNAs were mainly enriched in 40 signaling pathways, some of which were closely related to ovum development, such as MAPK signaling pathway, insulin signaling pathway, TGF- $\beta$ , PI3K-Akt signaling pathway, etc. PPI network interaction analysis was performed on the target genes of MAPK and TGF- $\beta$  signal, and the target genes with high correlation with MAPK signal pathway were screened out as FGFR1, KRAS, BDNF, BRAF, EGFR and IGF1R. SMAD2, ACVR1, BMP4, SMAD4 and TGFB1 were the target genes with high correlation with TGF- $\beta$  signaling pathway. **Conclusions** This study suggests that follicular fluid specific exosome miRNAs may play a crucial role in regulating ovum maturation, granulosa cell proliferation and apoptosis, and steroid hormone formation.

**【Key words】** follicular fluid; exosomal microRNAs; miRNA microarray analysis; bioinformatics analysis

卵泡液是影响卵母细胞质量的重要因素,为卵母细胞生长、发育和成熟提供最赖以生存的微环境。卵泡液中含有各种信号传递因子,参与卵母细胞和体细胞之间的相互沟通交流作用。外泌体是一种直径在 30~250 nm 的膜性囊泡,包含蛋白质、脂质、mRNA、miRNA、lncRNA 等各种活性物质,是一种新型的细胞间沟通媒介,可以将卵泡液中的活性物质传递到靶细胞而在卵母细胞-体细胞的通讯过程中发挥重要作用。miRNAs 是一类由 20~24 个核苷酸组成的小 RNA,可以通过转录后机制调控基因表达,在生物分化、增殖周期和细胞凋亡等过程中发挥着重要作用<sup>[1]</sup>。研究表明,人类卵泡液中有 200 多种以外泌体或游离形式存在的 miRNA,与卵子的发育成熟息息相关<sup>[2]</sup>。也有实验表明,卵泡液中的外泌体可以在细胞间运输传递 miRNAs,直接影响卵子的成熟<sup>[3,4]</sup>。本研究通过筛选卵泡液中特异性表达的 miRNAs,探讨其在卵子发育成熟中可能的调控作用,以期对卵母细胞生长发育的机制研究提供一定的理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 研究对象

入组患者为 2017 年 9 月至 2018 年 3 月于河南省人民医院生殖医学中心因单纯输卵管因素不孕就诊的患者 30 例,于取卵日当天收取第一管清亮无血液污染的卵泡液,提取、纯化卵泡液外泌体为实验组,同时于取卵日当天早晨抽取入组患者的外周血,提取、纯化血清外泌体作为对照组,促排卵方案均为卵泡期长效方案。入组患者均为年龄 <35 岁,双侧窦卵泡数 >5~7 个,既往 6 个月内未行激素替代治疗,均排除糖尿病、高胰岛素血症、库欣综合征、甲状腺功能障碍、高泌乳素血症等内分泌疾病。本研究经河南省人民医院伦理委员会批准(SYSZ-LL-2017080401),纳入者或家属均签署知情同意书。

### 1.2 主要试剂与仪器

Exoquick TM 外泌体提取试剂盒(SBI, 美国), RNeasy Mini Kit 试剂盒(Qiagen, 德国),兔 CD63 抗体(abcam, 英国),兔 CD9 抗体(abcam, 英国),兔  $\alpha$ -tubulin 抗体(abcam, 英国),抗兔二抗(abcam, 英国),BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),透射电子显微镜(JEOL, 日本),NanoDrop ND-2000 分光光度计(Thermo Fisher Scientific, 美国),Agilent2100 生物分析仪(Agilent Technologies, 美国)。

### 1.3 外泌体提取、纯化与鉴定

实验组于取卵日当天收取第一管清亮无血液污染的卵泡液,4℃ 下 1 500 rpm 离心 10 min,取上清保存于 -80℃ 冰箱里备用。对照组于取卵日当天早晨抽取入组患者外周血,4℃ 1 500 rpm 离心 10 min,取血清保存于 -80℃ 备用。采用 SBI 公司的 Exoquick TM 外泌体提取试剂盒提取外泌体,将 500  $\mu$ L 冷冻血清及卵泡液于冰上融化,3 000 g 离心 15 min 去除细胞碎片,按说明书加入外泌体提取试剂,将外泌体沉淀用 100  $\mu$ L PBS 重悬, -80℃ 备用。取 PBS 重悬的外泌体悬液 20  $\mu$ L,按照投射电镜使用说明制备样本,于透射电镜下拍照观察外泌体形态及大小。采用 Western Blotting 法检测外泌体表面特异性蛋白 CD9、CD63 的表达情况,所有操作均严格按照使用说明书进行。

### 1.4 外泌体 miRNA 提取及芯片检测分析

实验组的卵泡液及对照组的血清分别等量混合各取 3 mL 提取纯化外泌体后,严格按照 RNeasy Mini Kit 试剂盒说明书的操作步骤提取、纯化血清及卵泡液外泌体 miRNAs,采用 NanoDropnd-2000 分光光度计检测纯化的外泌体 miRNAs 的浓度及其完整性,送至上海欧易生物科技有限公司分别进行 miRNA 芯片检测及数据分析,筛选出仅在卵泡液中特异性表达的外泌体源性 miRNAs。

### 1.5 卵泡液特异性表达的外泌体 miRNAs 的生物信息学分析

对 1.4 中筛选出的卵泡液特异性外泌体 miRNAs 采用 miRDB 和 miRWalk 靶基因预测数据库预测靶基因,而后用 ClueGO 和 DAVID 软件对靶基因进行 GO 富集分析及 KEGG 信号通路分析,分析其可能参与的代谢途径。在 KEGG 富集信号通路中挑选目的通路,筛选参与该信号通路的可能关键性靶基因。

### 1.6 统计学方法

数据采用 SPSS 22.0 统计软件进行处理。计量资料均进行正态检验,符合正态分布的用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用  $t$  检验。所有实验数据均至少重复 3 遍。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 血清及卵泡液外泌体的鉴定结果

将制备的血清及卵泡液外泌体样本投于电子显微镜观察,可见外泌体是直径 30~250 nm 的圆形或椭圆形膜性囊泡,有着双层膜性结构,可单个分布,也可成群聚集分布,其形态及大小见图 1A。采用考马斯亮蓝染色剂染色、Western Blotting 法检测外泌体表面特异性蛋白 CD9、CD63。结果显示在血清及卵泡液外泌体中均存在特异性蛋白 CD9、CD63 的表达,见图 1B。

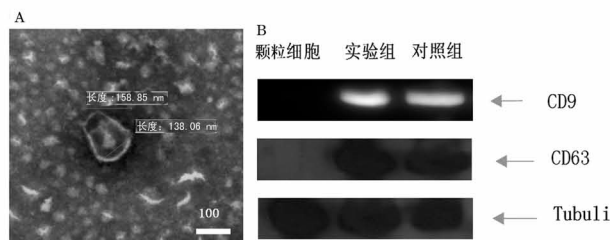


图 1 A 电镜下卵泡液外泌体的形态;

B 外泌体特异性蛋白 CD9、CD63 在两组中的表达

### 2.2 卵泡液特异性表达的外泌体 miRNAs 及其生物信息学分析结果

将血清及卵泡液外泌体源性 miRNAs 进行芯片检测分析,筛选出仅在卵泡液中特异性表达的外泌体 miRNAs,共 201 种(见下页图 2)。同时筛选出在 miRDB 和 miRWalk 靶基因预测数据库里存在靶基因的卵泡液外泌体 miRNAs,共 173 种,共预测到 3 938 个靶基因。将这些靶基因进行 GO 分析,结果显示基因主要富集在分子功能、细胞组成以及生物过程等领域,涉及蛋白结合、蛋白磷酸化、转录调控、信号传导等生物学过程(见图 3)。KEGG 信号通路富集分析,结果显示这些靶基因主要富集 40 种信号通路(见图 4,彩插 4)。我们注意

到,其中一些信号通路如丝裂原活化蛋白激酶信号 (MAPK signaling pathway)、Hippo、TGF-beta、PI3K-Akt、FoxO 信号通路、肿瘤坏死因子信号通路 (TNF signaling pathway)、胰岛素信号通路以及细胞减数分裂、细胞老化凋亡等信号通路与卵子发育相关,可能在调控卵子成熟、颗粒细胞增殖凋亡以及类固醇激素形成等方面发挥重要作用。

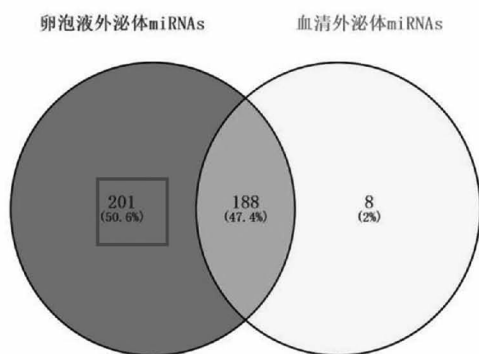


图 2 卵泡液中特异性表达的外泌体 miRNAs

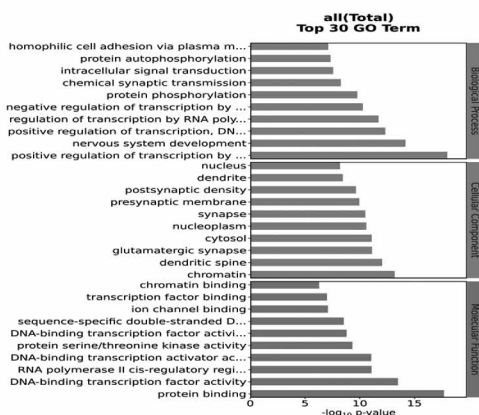


图 3 卵泡液特异性表达的外泌体 miRNAs 靶基因的 GO 富集分析图

### 2.3 相关信号通路关键性靶基因的筛选结果

生物信息学分析结果显示,参与 MAPK 信号通路的靶基因共 210 个,参与 TGF-beta 信号通路的靶基因共 69

个。采用 Cytoscape 软件分别做参与 MAPK、TGF-beta 信号通路的靶基因的 PPI 互作分析网络,取 PPI 互作结果中的 top20 关系对做 PPI 网络图 (见图 5A、B),从而筛选出其可能的关键性靶基因。结果显示,与 MAPK 信号通路关联度较高的靶基因有 FGFR1、KRAS、BDNF、BRAF、EGFR、IGF1R 等;与 TGF-beta 信号通路关联度较高的靶基因有 SMAD2、ACVR1、BVP4、SMAD4、TGFBRI 等。这些靶基因在各自的信号通路中发挥着重要的调控作用,可能与卵子的生长、成熟、激素的分泌有着至关重要的关系。

### 3 讨论

卵泡液是卵母细胞生长发育赖以生存的微环境,卵泡内卵母细胞与体细胞之间的细胞-细胞间的通信交流对卵泡分化、卵母细胞成熟、受精和胚胎发育有着至关重要的作用。外泌体作为媒介可以将蛋白质、mRNA 和 miRNAs 等活性物质转移到靶细胞中,在细胞间的通讯交流中发挥重要作用。现有研究表明,人类卵泡液的外泌体 miRNA 与卵母细胞的成熟和质量密切相关。

本研究通过对入组患者血清及卵泡液中的外泌体 miRNAs 进行测序分析,筛选出卵泡液中特异性表达的外泌体 miRNAs,预测靶基因后对其进行 GO 分析及 KEGG 信号通路富集,GO 分析结果显示靶基因主要涉及蛋白结合、蛋白磷酸化、转录调控、信号传导等生物学过程;KEGG 信号通路富集结果显示,卵泡液特异性外泌体 miRNAs 主要集中表达在 MAPK 信号通路、胰岛素信号通路、Hippo、TGF-beta、PI3K-Akt、FoxO 信号通路、细胞减数分裂、细胞老化凋亡等。已有研究表明,MAPK 信号通路在生殖系统的发生发展中发挥着重要作用,如 ERK 通路可以调控卵母细胞减数分裂、卵子受精及颗粒细胞的生长,JNK 通路主要负责卵泡细胞的生长发育成熟,而 p38MAPK 信号通路则参与调控卵巢内各种细胞的凋亡<sup>[5]</sup>。MAP2K1、MAP3K1、PPM1A 均是 MAPK 家族的成员,在 MAPK 通路中起关键作用。MAP2K1 的磷酸化可以导致参与减数分裂的 MAPK3 和 MAPK1 的磷酸化,参与卵母细胞的成熟过程<sup>[6-7]</sup>;MAP3K1 已被报道在卵巢颗粒细胞中发挥抗凋亡作用<sup>[8]</sup>;PPM1A 可以通过多种信号通路起作用,包括 p38、MAPK、JNK 和 TGF-β,已

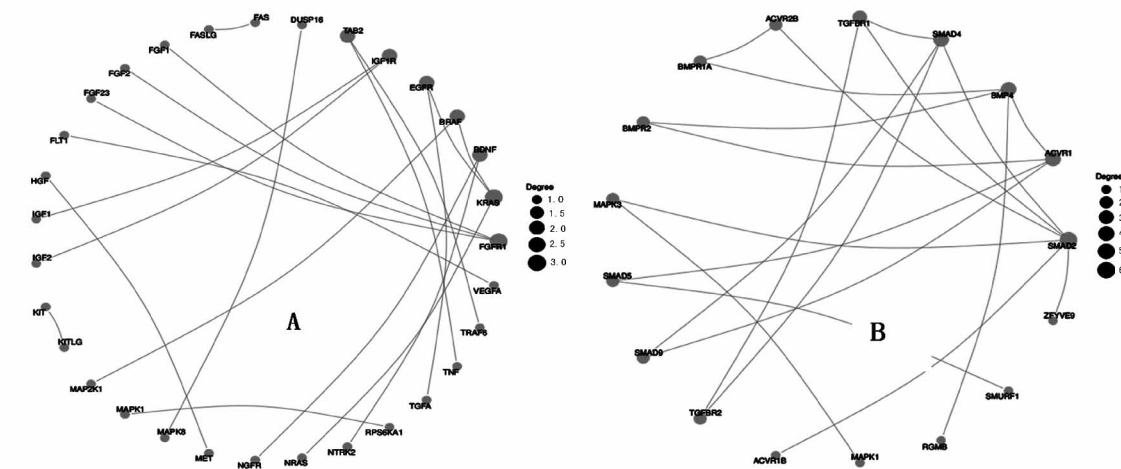


图 5 A:MAPK 信号通路 top20 关系对 PPI 互作网络图;B:TGF-beta 信号通路 top20 关系对 PPI 互作网络图

被认为在卵母细胞成熟中发挥重要作用<sup>[9]</sup>。研究表明,胰岛素信号通路不仅可以控制卵巢外类固醇激素的合成,还可以直接调节卵子发生的正常进程,卵巢内胰岛素信号通路调控紊乱可能导致卵母细胞对卵黄蛋白的摄取失败,从而引起初级卵母细胞的成熟受损,生长受阻<sup>[10]</sup>。对于 TGF- $\beta$ /SMAD 信号通路,大量文献报道与女性生育能力密切相关,可以影响卵泡闭锁以及颗粒细胞的凋亡,激活 TGF- $\beta$ /SMAD 信号通路可抑制卵泡颗粒细胞的凋亡<sup>[11-12]</sup>。本研究中,生物信息学分析结果显示卵泡液特异性外泌体 miRNA 的靶基因主要富集在 MAPK、TGF- $\beta$ 、胰岛素等已经被研究证实与卵子发生、颗粒细胞功能、类固醇激素的合成密切相关的信号通路,这表明卵泡液特异性外泌体 miRNA 可能通过细胞-细胞间的信号交流在卵子发育成熟中发挥着重要的调控作用,为卵母细胞生长发育的机制研究提供一定的理论基础。

同时,本研究通过对 MAPK、TGF- $\beta$  信号的靶基因进行 PPI 网络互作分析,筛选出与该通路关联度较高的关键性靶基因,如 TGF- $\beta$  信号通路中的 SMAD2、SMAD4,均是大量文献已证实的与卵子发育和颗粒细胞增殖凋亡密切相关的调控因子。对于 TGF- $\beta$ /SMAD 信号通路,研究表明参与该通路的核心因子 TGF- $\beta$ 1、TGFB2、SMAD2/3、SMAD4 是影响女性生殖的关键候选因子<sup>[13]</sup>,刚好与我们实验中筛选的与该通路关联度较高的关键性靶基因 SMAD2、SMAD4 这一结论相互验证。SMAD4 是 TGF- $\beta$ /SMAD 信号通路的一个非常重要的调控因子,它与调节性 SMADs 形成转录复合物,并通过结合细胞核内基因启动子来调节基因表达,现在越来越多的证据表明 SMAD4 对颗粒细胞的正常状态和功能以及卵母细胞的发育和成熟至关重要<sup>[14-15]</sup>。SMAD4 除表达于各级卵泡外,还表达在卵巢表面上皮细胞、黄体及间质细胞中<sup>[16]</sup>,通过调控 SMAD4 参与卵母细胞的募集、成熟、排卵等,同时也可以调控卵巢产生类固醇激素。所以,本研究表明,在 TGF- $\beta$  信号通路中,卵泡液特异性外泌体 miRNAs 可能通过调控 SMAD4 的表达在卵泡的各个阶段发挥重要的作用,但这需要后续研究来进一步验证。

## 【参考文献】

- [1] Kamalidehghan B, Habibi M, Afjeh SS, et al. The importance of small non-coding RNAs in human reproduction: a review article [J]. *Appl Clin Genet*, 2020, 13: 1-11.
- [2] 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.
- [3] 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 (3): 71.
- [4] da Silveira JC, Andrade GM, Del Collado M, et al. Supplementation with small-extracellular vesicles from ovarian follicular fluid during in vitro production modulates bovine embryo development [J]. *PLoS One*, 2017, 12 (6): e0179451.
- [5] Huang Z, Tian Z, Zhao Y, et al. MAPK signaling pathway is essential for female reproductive regulation in the cabbage beetle, *colaphellus bowringi* [J]. *Cells*, 2022, 11 (10): 1602.
- [6] Choi T, Fukasawa K, Zhou R, et al. The Mos/mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway regulates the size and degradation of the first polar body in maturing mouse oocytes [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996, 93 (14): 7032-7035.
- [7] Fan HY, Sun QY. Involvement of mitogenactivated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals [J]. *Biology of Reproduction*, 2003, 70 (3): 535-547.
- [8] Cao R, Wu W, Zhou X, et al. Let-7g induces granulosa cell apoptosis by targeting MAP3K1 in the porcine ovary [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2015, 68: 148-157.
- [9] Chuderland D, Dvashi Z, Kaplan-Kraicer R, et al. De novo synthesis of protein phosphatase 1A, magnesium dependent, alpha isoform (PPM1A) during oocyte maturation [J]. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 2012, 17 (3): 433-445.
- [10] Badisco L, Van Wielendaele P, Vanden Broeck J. Eat to reproduce: a key role for the insulin signaling pathway in adult insects [J]. *Frontiers in Physiology*, 2013, 4: 202.
- [11] Granados-Aparici S, Hardy K, Franks S, et al. SMAD3 directly regulates cell cycle genes to maintain arrest in granulosa cells of mouse primordial follicles [J]. *Sci Rep*, 2019, 9 (1): 6513.
- [12] Yao W, Du X, Zhang J, et al. SMAD4-induced knockdown of the antisense long noncoding RNA BRE-AS contributes to granulosa cell apoptosis [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2021, 25: 251-263.
- [13] Liu J, Qi N, Xing W, et al. The TGF- $\beta$ /SMAD signaling pathway prevents follicular atresia by upregulating MORC2 [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (18): 10657.
- [14] Du X, Li Q, Yang L, et al. SMAD4 activates Wnt signaling pathway to inhibit granulosa cell apoptosis [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11 (5): 373.
- [15] Liu L, Li Q, Yang L, et al. SMAD4 feedback activates the canonical TGF-beta family signaling pathways [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (18): 10024.
- [16] Lee KB, Zhang K, Folger JK, et al. Evidence supporting a functional 436 requirement of SMAD4 for bovine preimplantation embryonic development: a potential link 437 to embryotrophic actions of follistatin [J]. *Biol Reprod*, 2014, 91 (3): 62.
- [17] Zhang L, Du X, Wei S, et al. A comprehensive transcriptomic view on the role of SMAD4 gene by RNAi-mediated knockdown in porcine follicular granulosa cells [J]. *Reproduction*, 2016, 152 (1): 81-89.

(收稿日期: 2023-07-14 编辑: 牟术容)