

· 综 述 ·

卵泡液中细胞外囊泡及其携带的 microRNA 对卵泡发育的作用

王亨琴, 王晓梅, 孟凯, 公绪同, 王莹, 张涌, 权富生

西北农林科技大学 动物医学院 农业部动物生物技术重点实验室, 陕西 杨凌 712100

王亨琴, 王晓梅, 孟凯, 等. 卵泡液中细胞外囊泡及其携带的 microRNA 对卵泡发育的作用. 生物工程学报, 2020, 36(4): 632-642.

Wang HQ, Wang XM, Meng K, et al. Effect of extracellular vesicles and microRNAs in follicular fluid on follicular development. Chin J Biotech, 2020, 36(4): 632-642.

摘 要: 细胞外囊泡 (Extracellular vesicles, EVs) 是指细胞分泌的双层膜转运囊泡。EVs 能从细胞中摄取大分子物质, 并将其转移至受体细胞。在这些大分子物质中, 研究最多的就是 microRNA (miRNA)。miRNA 是一种参与基因表达调控的非编码 RNA, 已证实在哺乳动物卵泡液 EVs 中有不同的非编码 RNA 存在, EVs 携带 miRNA 可以作为自分泌和旁分泌的替代机制, 影响卵泡发育。文中系统介绍了 EVs 的种类、特征和分离鉴定方法, 重点综述了 EVs 及携带的 miRNA 对卵泡发育的作用, 包括早期卵泡发育、卵母细胞成熟、卵泡优势化以及对颗粒细胞功能的影响。同时对卵泡液中 EVs 及其携带的 miRNA 的未来研究进行了展望, 为卵泡液中 EVs 及携带的 miRNA 功能的研究及应用提供了思路 and 方向。

关键词: 卵泡液, 细胞外囊泡, microRNA, 卵泡发育

Effect of extracellular vesicles and microRNAs in follicular fluid on follicular development

Hengqin Wang, Xiaomei Wang, Kai Meng, Xutong Gong, Ying Wang, Yong Zhang, and Fusheng Quan

Key Laboratory of Animal Biotechnology, Ministry of Agriculture, College of Veterinary Medicine, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, Shaanxi, China

Abstract: Extracellular vesicles (EVs) refer to bilayer membrane transport vesicles secreted by cells. EVs can take macromolecules from cells and transfer them to receptor cells. Among these macromolecular substances, the most studied are microRNAs (miRNAs). miRNA is non-coding RNA involved in the regulation of gene expression. It has been confirmed that

Received: June 12, 2019; **Accepted:** July 25, 2019

Supported by: National Major Project (Nos. 2016ZX08007002, 2016ZX08007003).

Corresponding authors: Yong Zhang. Tel: +86-29-87080085; E-mail: zhangyong1956@nwsuaf.edu.cn
Fusheng Quan. Tel: +86-29-87080092; E-mail: quanfusheng@nwsuaf.edu.cn

国家科技重大专项 (Nos. 2016ZX08007002, 2016ZX08007003) 资助。

网络出版时间: 2019-08-06

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20190805.1059.003.html>

there are different non-coding RNAs in mammalian follicular fluid EVs. EVs carrying miRNA can act as an alternative mechanism for autocrine and paracrine, affecting follicular development. This paper systematically introduced the kinds, characteristics and methods of isolation and identification of EVs, focusing on the effects of EVs and miRNAs on follicular development, including early follicular development, oocyte maturation, follicular dominance and effects on granulosa cell function. At the same time, the authors prospected the future research of EVs and microRNAs in follicular fluid, and provided ideas and directions for the research and application of EVs and miRNA functions in follicular fluid.

Keywords: follicular fluid, extracellular vesicle, microRNA, follicular development

细胞外囊泡 (EVs) 是指细胞内携带的大分子物质转运至细胞外发挥生物学功能的双层膜囊泡。EVs 的释放和摄取是细胞间通讯的新机制, 其分离纯化及内容物 (主要组成物质) 功能的研究已成为现代生物技术领域研究的一个热点。

卵巢是雌性哺乳动物的生殖器官, 其一个重要功能是产生卵泡和维持卵泡发育, 卵泡发育到足够大小排出成熟卵子, 进行后代繁殖。卵泡发生的过程涉及体细胞与卵母细胞之间广泛的细胞间通讯, 卵泡膜细胞、颗粒细胞和卵母细胞在整个卵泡生长和成熟过程中分泌多种因子, 这些因子对卵泡发育至关重要。卵泡液中存在 EVs, 并对卵巢功能产生深远影响。EVs 中含有一些重要的 miRNA, 它可以在卵母细胞和周围的体细胞之间穿梭。目前对 EVs 中的 miRNA 在卵泡发育和卵母细胞成熟中的具体作用机制还知之甚少, 但最近的研究清楚地表明, EVs 及其内 miRNA 可以影响卵泡的发育和卵母细胞的成熟。文中对卵泡液中 EVs 和 miRNAs 进行了总结, 重点介绍了其调控卵泡发育及相关生物学功能的最新发现, 以期对相关领域研究的同行提供参考。

1 细胞外囊泡概述

1.1 细胞外囊泡的种类和特征

EVs 是由原核生物和真核生物释放的膜结构囊泡^[1-3], 包含多种生物活性分子——蛋白质、脂质和 RNA^[4-5]。EVs 已被证明含有蛋白质、脂质 (特别是高水平的鞘磷脂)、DNA 和各种 RNA, 包括 mRNA 和非编码 RNA (miRNA、circRNA 和 lncRNA 等)^[6]。EVs 膜上存在多种蛋白质, 包括

四跨膜蛋白 (CD63、CD9、CD81 等)、热休克蛋白 (Hsp70) 和糖磷脂酰肌醇锚定蛋白等^[7-10]。研究者已经分别从精液、附睾、输卵管、子宫液和卵泡液中分离出了 EVs^[11-14]。EVs 在大小、分子含量、生物遗传起源、性质和生物活性方面均具有高度异质性。

EVs 是细胞外生物流体中发现的所有类型的囊泡的统称^[15]。EVs 的种类主要包括微泡 (Microvesicle)、外泌体 (Exosome, EXO) 和凋亡小体。微泡也被称为脱落囊泡, 是细胞激活、损伤或凋亡后从细胞膜脱落的小囊泡。微囊泡生物发生涉及大分子运输到质膜、膜脂质的重新分布, 以及表面的机械收缩以允许囊泡释放。由于微泡是通过从质膜出芽形成的, 分子直径可达 100–1 000 nm^[16-18]。外泌体与微泡相似, 也是膜包围的小泡, 但外泌体储存在多泡体 (Multivesicular body, MVB) 中, 当 MVB 与质膜融合时, 这些外泌体又释放到细胞外环境中^[19] (图 1)。外泌体直径为 50–150 nm, 尺寸分布较均匀, 在电子显微镜下呈现出均一的、茶托状结构^[16] (图 2)。凋亡小体是细胞凋亡后期释放至胞外微环境的微粒, 富含死细胞碎片特有的凝聚 DNA。凋亡小体尺寸分布不均匀, 直径为 800–5 000 nm^[6,20-22]。由于微泡、外泌体和凋亡小体存在尺寸范围的重叠, 提取到的囊泡通常尺寸不均匀且难以区分其不同亚型, 因此将所分离得到的囊泡统称为 EVs。

EVs 对受体细胞的作用方式包括表面上的分子通过粘附到受体细胞表面的脂质和配体上, 使整个囊泡内化到受体细胞中, 或 EVs 的膜与受体膜融合, 从而将内容物释放入受体细胞, 实现

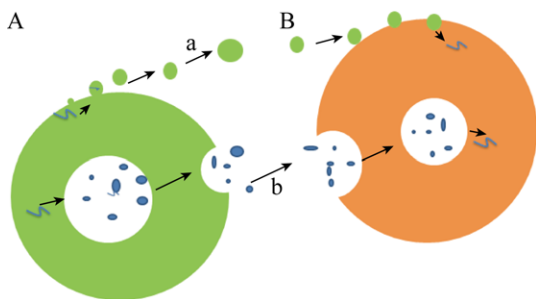


图1 细胞外囊泡的释放

Fig. 1 Release of extracellular vesicles. EVs are secreted by cell A to cell B. a: release of microvesicle. b: release of exosomes.

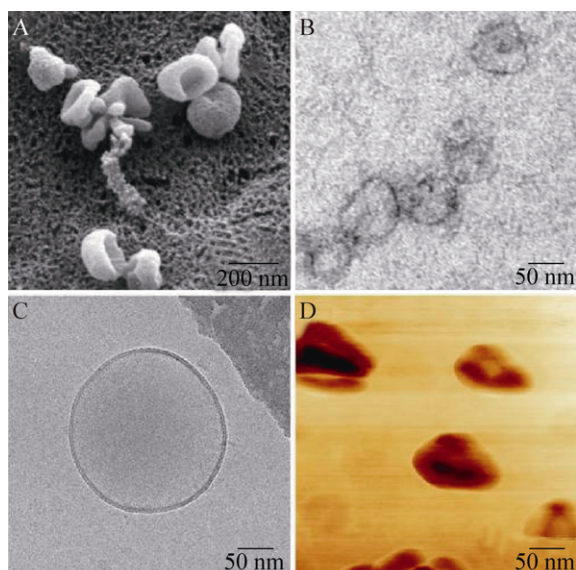


图2 外泌体的典型特征^[25]

Fig. 2 Typical characteristics of exosomes^[25]. (A) Scanning electron microscope image. (B) Transmission electron micrograph. (C) Frozen electron micrograph. (D) Atomic force microscopy.

与受体细胞的信息传递^[6,23]。通过上述方式, EVs 中的 mRNA 和 miRNA 可以转移到靶细胞^[24], 说明这些囊泡能够远距离运输并与靶细胞之间进行信息交换。

1.2 细胞外囊泡的分离纯化与鉴定

1.2.1 细胞外囊泡的分离纯化

EVs 存在于不同器官或者组织的体液中, 这些生物液体含有多种非囊泡性大分子结构, 可能会对 EVs 的分析结果产生影响。因此, EVs 分离

纯化非常重要。现有的分离纯化方法主要包括传统的高通量方法(如超速离心、密度梯度离心、沉淀法、分子排阻法、场流分级法)和新方法(如微流控法、非接触法、免疫吸附法)。

超速离心是分离 EVs 最常用的传统方法^[26]。先用细胞碎片在低离心力(300×g)去除细胞和细胞碎片, 再用高离心力(100 000×g)对 EVs 进行沉淀和浓缩^[27]。超速离心法是现在最广泛使用的“金标准”, 适用于从大量样品中纯化 EVs。密度梯度离心是基于超速离心的、更严格的形式, 密度梯度离心根据 EVs 的密度(1.15–1.19 g/mL)将其进一步纯化^[28]。在该方法中, 含有不同尺寸的囊泡和大分子的样品层叠在梯度的表面上, 其密度从顶部到底部逐渐增加。在离心过程中, 不同的分子以不同的速率沉淀在梯度中, 该方法被认为产生更高纯度的 EVs。Li 等改良了密度梯度离心法实现了 EVs 与非囊泡颗粒分离, 回收率更高、纯度更高, 并且结构和功能保持更好^[29]。

除超速离心和密度梯度离心之外, 沉淀法(商业试剂盒)和尺寸排阻色谱法也较为常用。商业试剂盒会降低 EV 的水合作用从而引起沉淀, 沉淀的 EVs 产品可以通过低离心力分离^[30]。但这种试剂盒还会产生非均相聚合物颗粒, 对于 EVs 而言缺乏特异性。尺寸排阻色谱法通过凝胶过滤不同大小的分子, 从而根据分子尺寸将 EVs 和其他分子分离^[31]。该分离方法最近已应用于囊泡分离, 从而从复杂的生物介质中产生纯化的 EV。具体应用时, 应考虑若干因素, 包括介质类型、孔径和 EVs 与介质之间的相互作用等, 以提高分离的效率和分辨率。

新的分离纯化方法主要有微流体过滤法、非接触法和免疫亲和富集法等。与传统方法相比, 这些新方法所需样本量较少, 且所需时间较短^[25]。

1.2.2 细胞外囊泡的纯度鉴定

在 EVs 的纯度鉴定方面, 其常用的检测方法主要包括透射电镜法、纳米粒径分析法(Nanosight)、Western blotting、流式细胞术法等。

其中,透射电子显微镜分辨率较高,能够观察到 EVs 典型的结构(均一的、茶托状结构)^[28]。此外,扫描电子显微镜、低温电子显微镜原子力显微镜^[28]等均可显示出典型的 EVs 的形态。Nanosight 可反映 EVs 的粒径分布,用于确定粒子的浓度和粒度分布。光束用于照射样品中的颗粒,当粒子散射光并经历布朗运动时,摄像机记录每个粒子的路径以确定平均速度和扩散率,从而得出其浓度和粒径分布^[32]。EVs 蛋白评估(如 Western blotting)用于证明样品中 EVs 相关的靶蛋白(如 CD63 和 TSG101 等)的存在^[33]。虽然该方法耗时较长,但可以对样品中靶蛋白定性,从而鉴定 EVs 纯度。流式技术能够实现高通量、单颗粒,同时检测多个参数^[28],是目前最有潜力应用于临床的外泌体分析技术。

1.3 细胞外囊泡内容物及其对卵泡发育的作用

来自供体细胞的携带有生物活性分子的 EVs 可利用体液到达靶细胞并递送其内容物。EVs 可以作为蛋白质和脂质传递的载体,是细胞间运输和通讯的一种重要机制。尽管如此,目前对 EVs 介导的细胞间通讯的了解仍然有限,许多问题尚未解决。在其他细胞模型中,已经证明 EVs 能够转移 miRNA、mRNA、线粒体 DNA 和蛋白质^[34-36]。

研究表明, EVs 可以分泌多种细胞因子^[37]。而细胞因子是卵巢生理学的关键调节因子,特别是与卵泡发生和排卵有关,细胞因子发挥多种生物学功能,从而建造支持卵泡发育的环境。某些细胞因子如 TGF- β 超家族成员,能够参与卵泡发生的所有阶段^[38]。但是,细胞因子及其相互作用的研究仍不完整,细胞因子调控卵泡发育的研究还比较匮乏, EVs 中细胞因子对卵泡发育的作用研究仍存在很大挑战。

对于 miRNA 调控卵泡发育的研究则较为丰富, miRNA 对人类和其他物种卵泡发育的调控作用至关重要。牛动情周期第 7 天从属卵泡和优势

卵泡的颗粒细胞 miRNA 表达模式显示颗粒细胞 miRNA 的表达可能与牛动情周期早期卵泡期的卵泡募集、选择和优势化相关^[39]。对牛大卵泡和小卵泡中颗粒细胞 miRNA 的表达比较,显示大卵泡中富含的 miRNA 参与卵泡细胞增殖、类固醇生成,从而预防因黄体退化引起的早产^[40]。因此, miRNA 可随卵泡发育阶段的不同而表现出差异表达,从而参与卵泡发育调控。

EVs 和 miRNA 代表了一种细胞间通讯的新机制,即细胞可以通过 EVs 传递 miRNA。有研究者分别收集了人血浆与卵泡液中的 EVs,并统计了两者之间差异表达的 miRNA,该研究结果显示,人类卵泡液中与血浆相比上调的 37 种 miRNA 在卵泡液中上调,且其中 32 个 miRNA 由外泌体携带^[41]。da Silveira 及其同事在马卵泡液中对 EVs 进行了鉴定^[42]。Sohel 等从牛卵泡液中分离出 EVs,并证明 EVs 能够转运 miRNA,且生长卵母细胞和成熟卵母细胞的卵泡液 EVs miRNA 差异表达^[43]。另有研究者证明了 EVs 存在于牛卵泡液中,且随着卵泡大小的变化,卵泡液所含的 EVs miRNA 存在动态变化,即随着卵泡直径的增加,5 种 miRNA (miR-204、miR-92b、miR-328a-3p、miR-424-3p 和 miR-450a) 的表达显著增加;2 种 miRNA (miR-19a-3p 和 miR-335) 表达显著减少^[44]。除此之外,牛卵泡液中的外泌体和非外泌体转运均对卵母细胞发育产生重要影响,这些影响是通过一系列 miRNA 起作用的^[43]。

2 细胞外囊泡中的 miRNA 在卵泡发育中的作用

细胞外囊泡中含有 miRNA,其中某些 miRNA 参与卵泡发育过程^[44-45]。文中对已经公开发表的、已证实存在于 EVs 的 miRNA 及其对卵泡发育的作用进行了总结(表 1),并对其作用机制进行了概述(表 2)。以下将进行详细探讨。

表 1 细胞外囊泡中的 miRNA 在卵泡发育中的作用

Table 1 Role of miRNAs in extracellular vesicles in follicular development

Function	miRNA in follicular fluid EVs	References
Formation and development of primordial follicle	miR-143; miR-145	[46], [48]
Oocyte development and follicular dominance	miR-145; miR-132; miR-378; miR-21;	[43,48], [43-44,63], [49,51], [43,49]
Granulosa cell proliferation and apoptosis	miR-145; miR-21; miR-26b	[52-53], [54-55], [56,58-59]
Granulosa cell steroidogenesis	miR-378; miR-132	[51-60], [62]

表 2 细胞外囊泡中 miRNA 的作用机制

Table 2 Action mechanism of miRNAs in extracellular vesicles

miRNA	Site of expression	Target	Function	Species	Reference
miR-143	Granulosa cells	<i>cyclin b1</i> ; <i>cyclin d2</i> ; <i>cyclin e2</i> ; <i>cdk4</i> , <i>cdk6</i>	Inhibiting the proliferation of granulosa cells and destroying the formation of primordial follicles	Mouse	[46]
miR-145	Granulosa cells	<i>cgfbr2</i> ; <i>acvrib</i> ; <i>klf4</i>	Inhibiting of target gene <i>tgfbr2</i> expression and downstream Smad signaling pathway to inhibit primordial follicle development and maintain dormancy of primordial follicle pool; down-regulating the ability to reduce oocyte growth; targeting <i>acvrib</i> inhibiting granulosa cell proliferation; targeting <i>klf4</i> to protect granulosa cells Oxidative stress-induced apoptosis	Mouse	[48,52-53]
miR-378	Granulosa cells	<i>cyp19a1</i>	Inhibition of COC expansion and oocyte maturation; Inhibition of <i>cyp19a1</i> expression leads to a significant decrease in estradiol secretion	Pig	[51]
miR-132	Granulosa cells	<i>nurr1</i>	Inhibition of <i>nurr1</i> to significantly promotes the expression of Cyp19a1 and estradiol.	Mouse	[62]
miR-21	Granulosa cells	<i>smad7</i>	Targeting <i>smad7</i> to block granulosa cell apoptosis	Mouse and rat	[54-55]
miR-26b	Granulosa cells	<i>has2</i> ; <i>smad4</i>	Targeting <i>has2</i> gene to promote apoptosis of granulosa cells; targeting <i>smad4</i> to down-regulation the anti-apoptotic <i>bcl-2</i> gene and promote granulosa cell apoptosis	Pig	[56,58-59]

2.1 细胞外囊泡中的 miRNA 影响原始卵泡的形成和发育

牛卵泡液 EVs 中含有多种 miRNA, 并且 miRNA 的种类和数目随着卵泡直径的增加有着显著差异。研究分析大、中、小卵泡 (大卵泡直径 >9mm, 中卵泡直径 6-9 mm, 小卵泡 3-5 mm)

miRNA 含量的不同, 发现在小卵泡中 miR-143 的表达量是大卵泡中表达量的 2 倍以上^[44]。在此之前, 研究者探究了 miR-143 在小鼠卵巢原始卵泡形成期间的表达和功能。从受精后 15.5 d 到产后 4 d, miR-143 表达在原始卵泡形成期间持续增加。进一步的研究表明, miR-143 通过抑制前颗粒细

胞的增殖和下调与细胞周期相关的基因 (*cyclin b1*、*cyclin d2*、*cyclin e2*) 和蛋白激酶基因 (*cdk4*、*cdk6*) 的表达来抑制原始卵泡的形成^[46]。

Andade 及其同事研究了牛卵泡中 miRNA 的来源, 主要涉及细胞和 EVs 这两种来源, 其中, miR-145 主要存在于卵丘-卵母细胞复合物分泌的 EVs 中, 而未在颗粒细胞分泌的 EVs 中发现^[47]。有研究者分析了新生小鼠卵巢中 miRNA 的表达模式, 鉴定了在 3 日龄和 5 日龄小鼠的卵巢之间丰度差异显著的 24 种 miRNA, 结果显示 48 个信号转导途径受上调的 miRNA 调节, 29 个途径受下调的 miRNA 调节, 并建立了 TGF- β 信号通路相关基因的 miRNA-mRNA 调节网络, 在参与该途径的 miRNA 中, 选择 miR-145 用于进一步分析。使用 RNA 拮抗剂 (AT) 组中原始卵泡的平均卵母细胞直径显著高于 AT 阴性对照 (AN) 组, 而 AT 组中生长卵泡的平均卵母细胞直径小于 AN 组。同时, 研究显示 miR-145 AT 显著降低卵泡发育相关基因 (*zp1*、*zp2* 和 *zp3*) 的 mRNA 表达水平, 表明 miR-145 的下调降低了卵母细胞生长的能力。miR-145 的增加会导致靶基因 *tgfbr2* 的表达降低和下游 Smad 信号传导途径的抑制, 以抑制原始卵泡发育的起始并维持原始卵泡池的休眠^[48]。小鼠上 miR-145 的下调使原始卵泡数量显著减少和卵泡生长增加, 在有腔卵泡的卵泡液 EVs 中的 miR-145 是否也有相似的作用, 从而调控原始卵泡的形成和发育以及有腔卵泡的发育, 目前还不得而知。

2.2 细胞外囊泡中的 miRNA 影响卵母细胞发育和卵泡优势化

在早期卵泡发育中, 存在于卵丘-卵母细胞复合物分泌的 EVs 中的 miR-145 除了表现出对原始卵泡池的抑制之外, 还在牛的优势卵泡和从属卵泡中表现出差异表达, 在从属卵泡中含量更高。

miR-145 在卵母细胞的生长期表现出较大的转录活性, 这就暗示其与卵泡发育和优势化有关^[43]。而在分子水平上, 使用 miR-145 RNA 拮抗剂 (AT) 组显著降低了小鼠卵泡发育相关基因 (*zp1*、*zp2* 和 *zp3*) 的 mRNA 表达水平^[48], 表明 miR-145 的下调降低了卵母细胞生长的能力, miR-145 与卵泡的发育和优势化密切相关。

除了 miR-145 以外, miR-212、miR-132、miR-224、miR-378 和 miR-21 均在马优势卵泡和从属卵泡中差异表达, 且在从属卵泡中, miR-145、miR-132 和 miR-378 的水平更高^[43,49-50]。其中, miR-132 能在牛颗粒细胞分泌的 EVs 中检测到^[47]。MiR-132 在牛大卵泡 (直径 >9 mm) 细胞外囊泡的含量是小卵泡 (直径 3-5 mm) 的 17 倍^[44]。

在牛卵泡液 EVs 中, miR-378 随着卵泡增大含量降低, 小卵泡 (直径 3-5 mm) 中的含量是大卵泡 (直径 >9 mm) 的 2 倍以上^[44], 且从属卵泡的含量显著高于健康生长的优势卵泡^[43]。未排卵卵泡的 miR-378 水平较高, 而 IGF1 水平较低^[49]。在卵丘卵母细胞成熟期间, 卵丘细胞中 miR-378 的过度表达削弱了与卵丘扩张相关基因 (*has2*、*ptgs2*) 和卵母细胞成熟相关基因 (*cx43*、*adamts1*、*pgr*) 的表达^[51]。上述结果表明, 在卵丘细胞中, miR-378 的表达能够抑制卵丘卵母细胞复合体的扩张和卵母细胞成熟。

与 miR-378 类似, 随着卵泡的增大, 牛卵泡液 EVs 中 miR-21 的含量也逐渐降低^[44], 且同样地, 在牛从属卵泡与未排卵卵泡中 miR-21 含量居高, 优势卵泡中含量较低^[43]。

综上所述, 卵泡液 EVs 中存在 miR-145、miR-21、miR-132 和 miR-378, 与优势卵泡相比这 4 种 miRNA 均在马的从属卵泡中含量较高。但用排卵剂量的 hCG 处理优势卵泡得到黄体化卵泡后, miR-132 和 miR-21 含量均大幅上升, 更有趣

的是, *pten*、*btg2*、*rasa1* 和 *mecp2* 等基因在黄体化卵泡中含量与优势化卵泡相比则大幅降低^[49]。这几种基因与上述 miRNA 是否存在靶向关系从而调控马卵泡发育和优势化还不清楚。

2.3 细胞外囊泡中的 miRNA 影响颗粒细胞功能

2.3.1 细胞外囊泡中的 miRNA 影响颗粒细胞增殖和凋亡

颗粒细胞的增殖与凋亡对卵泡发育至关重要, EVs 及其内部的 miRNA 对颗粒细胞增殖与凋亡有重要影响。miR-145 存在于牛卵泡液 EVs 中^[47]。对小鼠的研究表明, miRNA-145 靶向 *acvrib*, 通过调节 Tgf- β 信号通路, 抑制颗粒细胞增殖^[52]。除此之外, miR-145 还可保护小鼠颗粒细胞免受氧化应激诱导的细胞凋亡。体外实验证明, H₂O₂ 处理 KGN 细胞和小鼠颗粒细胞显著下调了 miR-145 表达, 而 miR-145 过表达可以减弱 H₂O₂ 诱导的颗粒细胞凋亡^[52]。此外, 小鼠上的研究也证明, miR-145 通过靶向 *klf4* 保护颗粒细胞免受 H₂O₂ 诱导的细胞凋亡^[53]。总之, miR-145 在小鼠上通过靶向 *acvrib* 调控 Tgf- β 信号通路, 抑制颗粒细胞增殖, 通过靶向 *klf4* 保护颗粒细胞免受氧化应激诱导的细胞凋亡从而防止卵泡闭锁异常, 并可改善卵巢功能。

牛卵泡液细胞外囊泡中已证明含有 miR-21^[43]。在小鼠上也证明, miR-21 被确定为增殖性颗粒细胞向终末分化的黄体细胞转变所需的重要因子, 小鼠 miR-21 的敲除导致排卵率下降, 颗粒细胞中 miR-21 的缺失促进了细胞凋亡, 而 miR-21 的表达增加则对细胞凋亡具有保护作用^[54]。在大鼠中, 去甲肾上腺素 (NE) 以剂量依赖性方式调节初级颗粒细胞中 miR-21 的表达, miR-21 参与 NE 介导的大鼠颗粒细胞凋亡, 并通过靶向 *smad7* 阻断颗粒细胞凋亡^[55]。上述研究均证明了 miR-21 在小鼠和大鼠颗粒细胞中有抗细

胞凋亡作用。

牛卵泡液细胞外囊泡中也证明同时表达 miR-26b^[43]。透明质酸合成酶 2 (HAS2)-透明质酸 (HA)-CD44-Caspase-3 途径参与哺乳动物的颗粒细胞功能的调节, miR-26b 靶向 *has2* 基因调控 HAS2-HA-CD44-Caspase-3 信号通路进而促进猪颗粒细胞凋亡^[56]。同样地, miR-26b 调节猪颗粒细胞凋亡还有其他途径。Smad4 是转化生长因子 β 1 (Tgf- β 1) 信号通路的中枢介质, 与哺乳动物的生殖能力和卵巢卵泡的发育密切相关, *smad4* 的敲低增加了 GCs 的凋亡^[57]。有研究发现 miRNA-26b 靶向 *smad4* 基因的 3'非翻译区, 抑制了 *smad4* mRNA 和蛋白质水平, 促进颗粒细胞凋亡^[58]。以上研究表明了 miR-26b 可通过调控 Tgf- β 信号传导途径中 Smad4 的表达而在颗粒细胞中具有促凋亡作用。另外研究者针对健康卵泡, 早期闭锁和已经闭锁的猪卵泡构建 miRNA 表达谱, 并选择和分析差异表达的 miRNA, 发现在猪卵泡闭锁期间上调的 miR-26b 通过靶向 *atm* (Ataxia telangiectasia-mutated gene) 增加了 DNA 断裂的数量并促进了颗粒细胞的凋亡^[59]。但是这些 miRNA 是否来源于猪卵泡液 EVs, 还有待于进一步证实。

2.3.2 细胞外囊泡中的 miRNA 影响颗粒细胞类固醇生成

颗粒细胞类固醇生成对卵泡发育至关重要。有研究表明, miR-378 在小卵泡 EVs 中的含量是大卵泡的 2.4 倍, 且随着卵泡增大而逐渐减少^[44]。体外过表达和抑制实验表明, 猪 miR-378 通过靶向 *cyp19a1* 的 3' UTR 内的特定位点, 降低猪颗粒细胞中 Cyp19a1 蛋白表达和雌二醇产生, 卵丘细胞中的 Cyp19a1 表达也被 miR-378 抑制, 导致雌二醇产生显著降低^[60]。Cyp19a1 3' UTR 中的 2 个结合位点被鉴定并确认为猪 miR-378 的结合位点^[51,60]。

MiR-132 存在于牛颗粒细胞分泌的 EVs 中^[43-44], 可以对颗粒细胞类固醇生成产生重要影响。Nurr1 是一种抑制 Cyp19a1 表达的孤核受体^[61]。对小鼠的研究证明, *nurr1* 是 miR-132 的直接靶标, miR-132 通过抑制 *nurr1*, 显著促进 Cyp19a1 的表达和雌二醇的分泌^[62]。

3 EVs 未来研究展望

EVs 及其携带的 miRNA 已证明在卵泡发育过程中发挥了重要作用, 其调控关系较为复杂。但是, 对于卵泡液中 EVs 及携带的 miRNA 的功能研究还较为匮乏。现根据国内外研究现状和本实验室开展的工作, 对卵泡液 EVs 及携带的 miRNA 的相关研究提出以下研究内容和研究方向: (1) 卵泡液中的 EVs 如何有选择性地随着卵泡发育摄取有利于卵泡发育的 miRNA 和其他内含物, 影响卵母细胞发育进程和质量。(2) 不同物种卵泡液 EVs 特异性 miRNA 的筛选和鉴定以及作用途径的研究。(3) 卵泡液中 EVs 特异性 miRNA 在卵泡发育、卵泡优势化以及卵母细胞成熟过程中是否是通过进入卵泡不同受体细胞发挥多种生物学功能? (4) 卵泡液 EVs 及携带的 miRNA 的作用调控机制以及涉及的相关信号通路的研究。(5) 卵泡液 EVs 其他内容物对卵泡发育的作用研究。卵泡液 EVs 是否可以通过携带的其他内容物, 如蛋白质、脂质体、lncRNA、circRNA 等影响卵泡发育以及卵母细胞成熟等功能。(6) 卵泡液 EVs 其他内容物与卵泡液中 EVs miRNA 的互作研究。卵泡液中存在 EVs 还有特异性的蛋白质和其他成分, 这些成分与 miRNA 如何互作、如何协同发挥作用也是未来需要研究的内容和关注的重点。(7) 动物体激素、抗原、细胞因子以及其他外源性的物质是否对卵泡液 EVs 的成分和功能产生影响? 如何发挥作用和调控?

由于 miRNA 与靶基因间相互作用的复杂性以

及不同物种间 miRNA 作用途径的差异性, 卵泡液 EVs 及携带 miRNA 的功能研究任重而道远。但充分认识卵泡液 EVs 及携带的内容物对卵泡发育的作用、提高卵母细胞质量、充分利用家畜卵巢资源以及提高人类辅助生殖水平将有重要意义。

REFERENCES

- [1] Liu SL, Zhan YT, Luo JD, et al. Roles of exosomes in the carcinogenesis and clinical therapy of non-small cell lung cancer. *Biomed Pharmacother*, 2019, 111: 338–346.
- [2] Oliveira DL, Nakayasu ES, Joffe LS, et al. Characterization of yeast extracellular vesicles: evidence for the participation of different pathways of cellular traffic in vesicle biogenesis. *PLoS ONE*, 2010, 5(6): e11113.
- [3] Mantel PY, Marti M. The role of extracellular vesicles in *Plasmodium* and other protozoan parasites. *Cell Microbiol*, 2014, 16(3): 344–354.
- [4] Willms E, Cabañas C, Mäger I, et al. Extracellular vesicle heterogeneity: subpopulations, isolation techniques, and diverse functions in cancer progression. *Front Immunol*, 2018, 9: 738.
- [5] Camussi G, Deregibus MC, Tetta C. Paracrine/endocrine mechanism of stem cells on kidney repair: role of microvesicle-mediated transfer of genetic information. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2010, 19(1): 7–12.
- [6] Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9(8): 581–593.
- [7] Wubbolts R, Leckie RS, Veenhuizen PTM, et al. Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes: potential implications for their function and multivesicular body formation. *J Biol Chem*, 2003, 278(13): 10963–10972.
- [8] Laulagnier K, Motta C, Hamdi S, et al. Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization. *Biochem J*, 2004, 380(1): 161–171.
- [9] Subra C, Laulagnier K, Perret B, et al. Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie*, 2007, 89(2):

- 205–212.
- [10] Harding CV, Heuser JE, Stahl PD. Exosomes: looking back three decades and into the future. *J Cell Biol*, 2013, 201(3): 485.
- [11] Hung WT, Navakanitworakul R, Khan T, et al. Stage-specific follicular extracellular vesicle uptake and regulation of bovine granulosa cell proliferation. *Biol Reprod*, 2017, 97(4): 644–655.
- [12] Hung WT, Hong X, Christenson LK, et al. Extracellular vesicles from bovine follicular fluid support cumulus expansion. *Biol Reprod*, 2015, 93(5): 117.
- [13] Saez F, Frenette G, Sullivan R. Epididymosomes and prostasomes: their roles in posttesticular maturation of the sperm cells. *J Androl*, 2003, 24(2): 149–154.
- [14] Al-Dossary AA, Strehler EE, Martin-DeLeon P. Expression and secretion of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase 4a (PMCA4a) during murine estrus: association with oviductal exosomes and uptake in sperm. *PLoS ONE*, 2013, 8(11): e80181.
- [15] Lötvall J, Hill AF, Hochberg F, et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles*, 2014, 3(1): 26913.
- [16] O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, et al. Overview of MicroRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018, 9: 402.
- [17] Yin PB, Lv HC, Li Y, et al. Exosome-mediated genetic information transfer, a missing piece of osteoblast-osteoclast communication puzzle. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2017, 8: 336.
- [18] van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(4): 213–228.
- [19] Navarro-Tableros V, Gomez Y, Camussi G, et al. Extracellular vesicles: new players in lymphomas. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(1): 41.
- [20] Crescitelli R, Lässer C, Szabó TG, et al. Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *J Extracell Vesicles*, 2013, 2(1): 20677.
- [21] El Andaloussi S, Mäger I, Breakefield XO, et al. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov*, 2013, 12(5): 347–357.
- [22] Traver S, Assou S, Scalici E, et al. Cell-free nucleic acids as non-invasive biomarkers of gynecological cancers, ovarian, endometrial and obstetric disorders and fetal aneuploidy. *Hum Reprod Update*, 2014, 20(6): 905–923.
- [23] Record M, Subra C, Silvente-Poirot S, et al. Exosomes as intercellular signalosomes and pharmacological effectors. *Biochem Pharmacol*, 2011, 81(10): 1171–1182.
- [24] Lv MM, Zhu XY, Chen WX, et al. Exosomes mediate drug resistance transfer in MCF-7 breast cancer cells and a probable mechanism is delivery of P-glycoprotein. *Tumour Biol*, 2014, 35(11): 10773–10779.
- [25] Shao HL, Im H, Castro CM, et al. New technologies for analysis of extracellular vesicles. *Chem Rev*, 2018, 118(4): 1917–1950.
- [26] Gardiner C, di Vizio D, Sahoo S, et al. Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey. *J Extracell Vesicles*, 2016, 5(1): 32945.
- [27] Hoffman RM. Stromal-cell and cancer-cell exosomes leading the metastatic exodus for the promised niche. *Breast Cancer Res*, 2013, 15(3): 310.
- [28] Théry C, Amigorena S, Raposo G, et al. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol*, 2006, 30(1): 3.22.1–3.22.29.
- [29] Li K, Wong DK, Hong KY, et al. Cushioned-density gradient ultracentrifugation (C-DGUC): a refined and high performance method for the isolation, characterization, and use of exosomes//Patel T, Ed. *Extracellular RNA: Methods and Protocols*. New York, NY: Humana Press, 2018: 69–83.
- [30] Vogel R, Coumans FAW, Maltesen RG, et al. A standardized method to determine the concentration of extracellular vesicles using tunable resistive pulse sensing. *J Extracell Vesicles*, 2016, 5(1): 31242.
- [31] Nordin JZ, Lee Y, Vader P, et al. Ultrafiltration with size-exclusion liquid chromatography for high yield isolation of extracellular vesicles preserving intact biophysical and functional properties. *Nanomedicine*, 2015, 11(4): 879–883.

- [32] Shao HL, Chung J, Balaj L, et al. Protein typing of circulating microvesicles allows real-time monitoring of glioblastoma therapy. *Nat Med*, 2012, 18(12): 1835–1840.
- [33] Lobb RJ, Becker M, Wen SW, et al. Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *J Extracell Vesicles*, 2015, 4(1): 27031.
- [34] Yáñez-Mó M, Siljander PRM, Andreu Z, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*, 2015, 4(1): 27066.
- [35] Lo Cicero A, Stahl PD, Raposo G. Extracellular vesicles shuffling intercellular messages: for good or for bad. *Curr Opin Cell Biol*, 2015, 35: 69–77.
- [36] Urbanelli L, Magini A, Buratta S, et al. Signaling pathways in exosomes biogenesis, secretion and fate. *Genes (Basel)*, 2013, 4(2): 152–170.
- [37] Kandere-Grzybowska K, Letourneau R, Kempuraj D, et al. IL-1 induces vesicular secretion of IL-6 without degranulation from human mast cells. *J Immunol*, 2003, 171(9): 4830–4836.
- [38] Field SL, Dasgupta T, Cummings M, et al. Cytokines in ovarian folliculogenesis, oocyte maturation and luteinisation. *Mol Reprod Dev*, 2014, 81(4): 284–314.
- [39] Salilew-Wondim D, Ahmad I, Gebremedhn S, et al. The expression pattern of microRNAs in granulosa cells of subordinate and dominant follicles during the early luteal phase of the bovine estrous cycle. *PLoS ONE*, 2014, 9(9): e106795.
- [40] Zhang BY, Chen L, Feng GD, et al. MicroRNA mediating networks in granulosa cells associated with ovarian follicular development. *BioMed Res Int*, 2017, 2017: 4585213.
- [41] Santonocito M, Vento M, Guglielmino MR, et al. Molecular characterization of exosomes and their microRNA cargo in human follicular fluid: bioinformatic analysis reveals that exosomal microRNAs control pathways involved in follicular maturation. *Fertil Steril*, 2014, 102(6): 1751–1761.e1.
- [42] da Silveira JC, de Andrade GM, Nogueira MFG, et al. Involvement of miRNAs and cell-secreted vesicles in mammalian ovarian antral follicle development. *Reprod Sci*, 2015, 22(12): 1474–1483.
- [43] Sohel MH, Hoelker M, Noferesti SS, et al. Exosomal and non-exosomal transport of extra-cellular microRNAs in follicular fluid: implications for bovine oocyte developmental competence. *PLoS ONE*, 2013, 8(11): e78505.
- [44] Navakanitworakul R, Hung WT, Gunewardena S, et al. Characterization and small RNA content of extracellular vesicles in follicular fluid of developing bovine antral follicles. *Sci Rep*, 2016, 6: 25486.
- [45] Machtinger R, Laurent LC, Baccarelli AA. Extracellular vesicles: roles in gamete maturation, fertilization and embryo implantation. *Hum Reprod Update*, 2016, 22(2): 182–193.
- [46] Zhang JF, Ji XW, Zhou DD, et al. miR-143 is critical for the formation of primordial follicles in mice. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2013, 18: 588–597.
- [47] Andrade GM, Meirelles FV, Perecin F, et al. Cellular and extracellular vesicular origins of miRNAs within the bovine ovarian follicle. *Reprod Domest Anim*, 2017, 52(6): 1036–1045.
- [48] Yang SH, Wang S, Luo AY, et al. Expression patterns and regulatory functions of MicroRNAs during the initiation of primordial follicle development in the neonatal mouse ovary. *Biol Reprod*, 2013, 89(5): 126.
- [49] Donadeu FX, Schauer SN. Differential miRNA expression between equine ovulatory and anovulatory follicles. *Domest Anim Endocrinol*, 2013, 45(3): 122–125.
- [50] Schauer SN, Sontakke SD, Watson ED, et al. Involvement of miRNAs in equine follicle development. *Reproduction*, 2013, 146(3): 273–282.
- [51] Pan B, Toms D, Shen W, et al. MicroRNA-378 regulates oocyte maturation *via* the suppression of aromatase in porcine cumulus cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2015, 308(6): E525–E534.
- [52] Yan GJ, Zhang LX, Fang T, et al. MicroRNA-145 suppresses mouse granulosa cell proliferation by targeting activin receptor IB. *FEBS Lett*, 2012, 586(19): 3263–3270.
- [53] Xu L, Sun HX, Zhang M, et al. MicroRNA-145 protects follicular granulosa cells against oxidative stress-induced apoptosis by targeting Krüppel-like factor 4. *Mol Cell Endocrinol*, 2017, 452: 138–147.
- [54] Carletti MZ, Fiedler SD, Christenson LK. MicroRNA 21 blocks apoptosis in mouse periovulatory granulosa cells. *Biol Reprod*, 2010, 83(2): 286–295.

- [55] Zhang L, Gao J, Cui S. miR-21 is involved in norepinephrine-mediated rat granulosa cell apoptosis by targeting *SMAD7*. *J Mol Endocrinol*, 2017, 58(4): 199–210.
- [56] Liu JY, Tu F, Yao W, et al. Conserved miR-26b enhances ovarian granulosa cell apoptosis through HAS2-HA-CD44-Caspase-3 pathway by targeting HAS2. *Sci Rep*, 2016, 6: 21197.
- [57] Li QL, Graff JM, O'Connor A E, et al. SMAD3 regulates gonadal tumorigenesis. *Mol Endocrinol*, 2007, 21(10): 2472–2486.
- [58] Liu JY, Du X, Zhou JL, et al. MicroRNA-26b functions as a proapoptotic factor in porcine follicular Granulosa cells by targeting Sma-and Mad-related protein 4. *Biol Reprod*, 2014, 91(6): 146.
- [59] Lin F, Li R, Pan ZX, et al. miR-26b promotes granulosa cell apoptosis by targeting *ATM* during follicular atresia in porcine ovary. *PLoS ONE*, 2012, 7(6): e38640.
- [60] Xu SY, Linher-Melville K, Yang BB, et al. Micro-RNA378 (miR-378) regulates ovarian estradiol production by targeting aromatase. *Endocrinology*, 2011, 152(10): 3941–3951.
- [61] Wu YM, Ghosh S, Nishi Y, et al. The orphan nuclear receptors NURR1 and NGFI-B modulate aromatase gene expression in ovarian granulosa cells: a possible mechanism for repression of aromatase expression upon luteinizing hormone surge. *Endocrinology*, 2005, 146(1): 237–246.
- [62] Wu SG, Sun HX, Zhang Q, et al. MicroRNA-132 promotes estradiol synthesis in ovarian granulosa cells *via* translational repression of *Nurr1*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2015, 13: 94.
- [63] Naji M, Nekoonam S, Aleyasin A, et al. Expression of miR-15a, miR-145, and miR-182 in granulosa-lutein cells, follicular fluid, and serum of women with polycystic ovary syndrome (PCOS). *Arch Gynecol Obstet*, 2018, 297(1): 221–231.

(本文责编 郝丽芳)