

miR-146 调控 TLR4/NF- κ B 通路减少卵泡颗粒细胞凋亡及干预卵巢早衰中的机制研究

何凤屏^{1,2}, 刘彦慧¹, 熊 符³, 唐 莉¹, 马秋林¹, 郭义红¹, 刘玉兰²

(1. 南方医科大学附属东莞妇幼保健院, 东莞市生殖与遗传研究所, 广东东莞 523125;

2. 汕头大学医学院附属粤北人民医院分子生物学实验室, 广东汕头 512026;

3. 南方医科大学基础医学院遗传重点实验室, 广州 510515)

摘要: **目的** 探究 miR-146 通过调控 Toll 样受体 4 (TLR4) / 核因子- κ B (NF- κ B) 减少卵泡颗粒细胞凋亡和干预卵巢早衰 (premature ovarian failure, POF) 的机制。**方法** 野生小鼠实验: 60 只 SPF 级 C57BL/6 小鼠随机分为对照组 ($n=30$) 和 POF 组 ($n=30$)。POF 组建立卵巢早衰模型, 造模后 15 天 qPCR 检测 2 组小鼠卵巢组织中 miRNA-146 表达水平; 基因敲除鼠实验: 40 只 C57BL/6 小鼠和 20 只 miR-146 敲除小鼠分为三组: 对照组 ($n=20$)、野生型 POF 组 ($n=20$) 和 miR-146 敲除 POF 组 ($n=20$), 野生型 POF 组和 miR-146 敲除 POF 组建立 POF 模型, 建模后 15 天 HE 染色分析各组小鼠卵巢组织病理情况及原始卵泡、初级卵泡、次级卵泡和闭锁卵泡数, ELISA 检测各组小鼠卵巢组织炎症信号通路分子 TLR, NF- κ B, 肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和白介素 6 (IL-6) 的表达水平; Western blot 检测卵巢组织凋亡蛋白 BCL2-Associated X 蛋白 (Bax), B 淋巴细胞瘤-2 基因 (Bcl2) 和 TLR4 信号通路蛋白 TLR4, NF- κ B 表达水平。**结果** 野生鼠实验表明与对照组相比, POF 组小鼠卵泡中 miR-146 表达水平下调 (0.51 ± 0.14 vs 1.52 ± 0.21), 差异具有统计学意义 ($t=7.338$, $P<0.01$); 基因敲除鼠实验表明: 与对照组相比, 野生型 POF 组和 miR-146 敲除 POF 组原始卵泡 (9.43 ± 2.03 , 6.43 ± 1.60 vs 16.82 ± 2.11)、初级卵泡 (6.15 ± 1.11 , 5.01 ± 1.10 vs 8.88 ± 1.12)、次级卵泡 (5.11 ± 1.71 , 4.01 ± 1.26 vs 7.11 ± 1.34) 均降低, 闭锁卵泡 (10.17 ± 1.41 , 11.46 ± 1.96 vs 7.18 ± 1.64) 升高, 差异具有统计学意义 ($F=7.787, 8.214, 9.726, 7.811$, 均 $P<0.01$)。与对照组相比, 野生鼠 POF 组和 miR-146 敲除 POF 组小鼠卵巢组织 TLR4 (68.18 ± 5.92 pg/ml, 91.11 ± 16.34 pg/ml vs 24.81 ± 2.81 pg/ml), NF- κ B (74.19 ± 8.11 pg/ml, 88.11 ± 16.71 pg/ml vs 68.18 ± 5.92 pg/ml), TNF- α (72.81 ± 2.10 pg/ml, 94.31 ± 2.26 pg/ml vs 28.07 ± 3.67 pg/ml) 和 IL-6 (69.19 ± 7.11 , 81.11 ± 16.34 vs 19.43 ± 10.81 pg/ml) 分泌显著升高, 差异均有统计学意义 ($F=6.281, 7.264, 8.724, 6.817$, 均 $P<0.01$); 与对照组相比, 野生鼠 POF 组和 miR-146 敲除 POF 组小鼠卵巢组织 Bax 蛋白表达水平降低 (1.18 ± 0.19 , 0.61 ± 0.14 vs 1.81 ± 0.21), Bcl2 蛋白表达升高 (0.59 ± 0.05 , 0.91 ± 0.05 vs 0.58 ± 0.02), TLR4 (1.10 ± 0.12 , 0.41 ± 0.04 vs 1.13 ± 0.11) 和 NF- κ B (0.81 ± 0.02 , 0.31 ± 0.06 vs 0.87 ± 0.27) 降低, 差异均有显著性统计学意义 ($F=7.235, 6.714, 7.612, 7.737$, 均 $P<0.01$)。**结论** miR-146 具有减少卵泡颗粒细胞凋亡的作用, 其机制可能与 TLR4/NF- κ B 信号通路的调控和抑制炎症因子的释放相关。

关键词: miR-146; 卵巢早衰; Toll 样受体 4 (TLR4) / 核因子- κ B (NF- κ B) 信号通路

中图分类号: R711.75; R392.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2023) 01-077-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2023.01.015

Study on the Mechanism of miR-146 in Reducing Follicular Granulosa Cell Apoptosis and Intervening Premature Ovarian Failure by Regulating TLR4/NF- κ B

HE Feng-ping^{1,2}, LIU Yan-hui¹, XIONG Fu³, TANG Li¹, MA Qiu-lin¹, GUO Yi-hong¹, LIU Yu-lan²

(Dongguan Institute of Reproduction and Genetics, Dongguan Maternal and Child Health Hospital Affiliated to Southern Medical University, Guangdong Dongguan 523125, China; 2. Molecular Biology Laboratory of Yuebei People's Hospital Affiliated to Medical College of Shantou University, Guangdong Shantou 512026, China; 3. Key Laboratory of Genetics, School of Basic Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of miR-146 in premature ovarian failure (premature ovarian failure,

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金项目 (2020B1515120009)。

作者简介: 何凤屏 (1968-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 分子生物学, E-mail: watering@aliyun.com。

通讯作者: 刘彦慧 (1971-), 男, 博士, 主任医师, 研究方向: 生殖与遗传学, E-mail: liuliang71215@163.com。

POF) model mice and its role and mechanism in premature ovarian failure and follicular apoptosis. **Methods** Wild mouse experiment: 60 SPF C57BL / 6 mice were randomly divided into control group ($n = 30$) and POF group ($n = 30$). POF group established premature ovarian failure model. 15 days after modeling, the expression level of miR-146 in the follicles of the two groups was detected by qPCR. Knockout mouse experiment: Forty C57BL / 6 mice and 20 miR-146 knockout mice were divided into three groups: control group ($n = 20$) and wild-type POF group ($n = 20$), miR-146 knockout POF group ($n = 20$), wild-type POF group and miR-146 knockout POF to establish POF model. 15 days after modeling, HE staining was used to analyze the ovarian pathology and the number of primordial follicles, primary follicles, secondary follicles and atretic follicles, Toll like receptor-4(TLR4) and Nuclear factor - κ B (NF- κ B), Tumor necrosis factor (TNF- α) and Interleukin-6 (IL-6) expression level were detected by ELISA. The apoptotic proteins BCL2-Associated X protein (Bax), B-cell lymphoma-2 (BCL2) and TLR4 Signal pathway proteins TLR4 and NF- κ B expression level were detected by Western blot. Results Compared with the control group, the expression level of miR-146 in follicles of POF group (0.51 ± 0.14 vs 1.52 ± 0.21) was down-regulated, and the difference was statistically significant ($t=7.338$, $P<0.01$). The knockout mice showed that: in the control group, the primordial follicles of POF and miR-146 were 9.43 ± 2.03 , 6.43 ± 1.60 vs 16.82 ± 2.11 , the primary follicles were 6.15 ± 1.11 , 5.01 ± 1.10 vs 8.88 ± 1.12 , the secondary follicles were 5.11 ± 1.71 , 4.01 ± 1.26 vs 7.11 ± 1.34 , and the atretic follicles were 10.17 ± 1.41 , 11.46 ± 1.96 vs 7.18 ± 1.64 , respectively, and the differences were statistically significant ($F=7.787$, 8.214 , 9.726 , 7.811 , all $P<0.01$). Compared with the control group, TLR4 (68.18 ± 5.92 , 91.11 ± 16.34 vs 24.81 ± 2.81 pg/ml), NF- κ B (74.19 ± 8.11 , 88.11 ± 16.71 vs 68.18 ± 5.92 pg/ml), TNF- α (72.81 ± 2.10 , 94.31 ± 2.26 vs 28.07 ± 3.67 pg/ml) and IL-6 (69.19 ± 7.11 , 81.11 ± 16.34 vs 19.43 ± 10.81 pg/ml) the secretion of was significantly increased, and the differences were statistical significance ($F=6.281$, 7.264 , 8.724 , 6.817 , all $P<0.01$). The expression level of Bax protein in ovarian tissue of wild mice in POF group and miR-146 knockout POF group decreased (1.18 ± 0.19 , 0.61 ± 0.14 vs 1.81 ± 0.21), and the expression level of Bcl2 protein increased (0.59 ± 0.05 , 0.91 ± 0.05 vs 0.58 ± 0.02), TLR4 decreased (1.10 ± 0.12 , 0.41 ± 0.04 vs 1.13 ± 0.11), and NF- κ B decreased (0.81 ± 0.02 , 0.31 ± 0.06 vs 0.87 ± 0.27), and the differences were statistical significance ($F=7.235$, 6.714 , 7.612 , 7.737 , all $P<0.01$). **Conclusion** miR-146 could reduce follicular cell apoptosis, and its mechanism would be related to the regulation of TLR4/NF- κ B signaling pathway is related to the inhibition of the production of inflammatory factors.

Keywords: miR-146; premature ovarian failure; TLR4/NF- κ B signal pathway

卵巢早衰 (premature ovarian failure, POF) 指卵巢功能衰竭所导致的 40 岁之前即闭经的现象, 影响女性绝经前的生理状态, 卵巢在预期的更年期之前就部分或全部丧失功能^[1]。在疾病的诊断症状中, 闭经和低雌激素症为主要症状, 激素疗法、体外激活和再生医学是 POF 最主要的治疗方法^[2]。表观遗传学研究表明 POF 伴随着 miR-146 等多种 microRNA 的调控^[3-5], 研究表明 microRNA-146 过表达通过抑制 Dab2ip/Ask1/p38 Mapk 通路和 γ H2A.X 磷酸化减轻小鼠 POF^[5], 同时分子生物学研究表明 POF 与炎症紧密相关, 从而导致女性出现了 POF 的现象^[6], 研究表明抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号间接降低 NLRP3 对 POF 发挥作用^[7], 也有研究证实 Toll 样受体 4/核因子 - κ B/高迁移率蛋白 B1(TLR4/NF- κ B/HMGB1) 信号通路是隐丹参酮调节并减轻大鼠多囊卵巢综合征的重要分子通路^[8], 可见 TLR4/NF- κ B 信号通路在调节小鼠卵泡发育和卵巢功能方面发挥作用, 因此本研究拟探究 miR-146 对卵巢功能的影响, 并是否对 TLR4/NF- κ B 信号通路有调控作用, 为 miR-146 在 POF 中的作用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 研究对象 100 只 7~8 周龄雌性 SPF 级 C57BL/6 小鼠, 体重 20 ± 2 g。20 只 7~8 周龄雌性 SPF 级 miRNA-146 敲除型小鼠, 体重 20 ± 20 g, 均由南方医科大学动物室提供。小鼠饲养环境温度 22 ± 2 °C, 湿度 $50\% \pm 5\%$, 12h 光照 12h 黑暗, 适应性饲养一周。

1.2 仪器与试剂 miR-146 及 U6 引物由吉赛生物有限公司合成; miR-146 质粒和 NC 质粒由吉玛基因生物有限公司提供; 小鼠 TLR4 ELISA 试剂盒和小鼠 IL-6 ELISA 试剂盒 (武汉菲恩生物有限公司, 货号: EM0451, EM0121), 小鼠 NF- κ B ELISA 试剂盒 (上海木来科技有限公司, 货号: SBJ-M0707-48T), 小鼠 TNF- α ELISA 试剂盒 (英国 abcam 公司, 货号: ab46105); Lipofectamine 3000 Reagent (美国 Thermo Fisher 公司)。

1.3 方法

1.3.1 小鼠 POF 模型建立: 根据参考文献 [9-10] 通过注射透明带 3 肽 (Zona pellucida 3 peptide, pZP3) 建立 POF 小鼠模型及 miR-146 敲除 POF 小鼠模型, 模型建立由南方医科大学动物室进行。

1.3.2 卵巢组织 HE 染色: 断颈处死小鼠, 分离各组小鼠卵巢组织, 于 4 g/dl 多聚甲醛中固定 48h,

经石蜡包埋后制备成厚度为 5 μm 切片，苏木精染色，伊红复染，中性树胶封片，于显微镜下观察卵巢病理状态并统计原始卵泡、初级卵泡、次级卵泡和闭锁卵泡数量。

1.3.3 各组小鼠卵巢组织 miRNA-16 表达水平的检测：卵巢组织用液氮研磨后，使用 miRNA 逆转录和扩增使用 cDNA Synthesis Kit 试剂盒和 SYBR Green PCR Master Mix Kit，使用 U6 作为 miRNA 的对照，所有操作在冰上进行并避免 RNA 酶污染。使用 Applied Biosystems ABI 7500(美国)系统进行实时荧光定量 PCR，miR-146-F 5'-ACCAGCAGTCCTC TTGATGC-3'，miR-146-R 5'-GACGAGCTGCTTCA AGTTCC-3'，U6-F 5'-CTCGCTTCGGCAGCA CA-3'，U6-R 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3，反应条件为：95℃预变性 10 min，95℃变性 15 s，55℃退火 15 s，35 个循环，以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 miR-146 相对表达量。

1.3.4 ELISA 检测卵巢组织炎症因子：在预冷的 PBS 中清洗卵巢组织，均浆后 4℃ 3 000 r/min 10min 后去掉沉淀，严格按照试剂盒说明书将上清液分别加入 TLR4，TNF-α，NF-κB 和 IL-6 酶标抗体，室温孵育 30 min，每孔加入酶标底物液 100 μl，避光室温孵育 5 min，加入反应终止液终止反应，每孔 50 μl，于酶联检测仪测定 450nm 检测吸光度 A 值。

1.3.5 Western blot 检测卵巢组织 Bax，Bcl2，TLR4 及 NF-κB 蛋白表达：将卵巢组织液氮研磨后用 RIPA 裂解液裂解，使用 BCA 法测定蛋白浓度。加入 5×SDS 的蛋白上样缓冲液煮沸后冻于 -80℃ 备用。将样品分别加入不同的泳道进行聚丙烯酰胺凝胶电泳，浓缩胶电压 80V，10min，分离胶电压

120V，2h，后转至 PVDF 膜，采用 BSA 封闭。分别加入特异度一抗 Bax (1:5 000，ab32503，abcam，英国)，Bcl-2 (1:1 000，ab32124，abcam，英国)，TLR4 (1:500，ab13556，abcam，英国)，NF-κB (1:5 000，ab32536，abcam，英国)和 GAPDH (1:5000，ab8245，abcam，英国)于 4℃ 冰箱过夜。TBST 洗膜 3 次，加入特异度的羊抗兔二抗 (1:10 000)，孵育 1h。TBST 洗膜 3 次，采用 ECL 化学发光液曝光显影，使用 Image J 图像分析软件系统进行半定量分析。

1.4 统计学分析 采用 SPSS23.0 软件进行统计分析，计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。满足正态分布且方差齐性采用 Student's *t* 检验，多组间比较采用 ANOVA 方差分析，*P* < 0.05 为差异有统计学意义。Graphpad 8 software 进行图表绘制。

2 结果

2.1 小鼠一般情况及小鼠卵巢组织 miR-146 表达水平 小鼠一般情况：正常组小鼠的毛光亮、动作灵敏、活跃、摄食频繁，对外界刺激的反应性良好。POF 组小鼠毛色泽暗淡，活动少，摄食少，对外界刺激的反应性相对较差。对照组和 POF 组小鼠卵泡中 miR-146 表达分别为 1.52 ± 0.21 和 0.51 ± 0.14 ，差异有统计学意义 (*t* = 7.338，*P* < 0.01)。

2.2 小鼠卵巢病理学比较分析 通过 HE 染色分析各组小鼠卵巢病理学差异，结果表明对照组可见不同发育阶段的卵泡，成熟卵泡处于卵巢的边缘，颗粒细胞排列规则有序；野生鼠 POF 组和 miR-146 敲除鼠 POF 组的小鼠卵巢间质均出现纤维化改变，卵泡闭锁，卵泡颗粒细胞减少、排列紊乱，甚至消失、转化为结缔组织细胞。见表 1。各组各时期的卵泡差异均有统计学意义 (均 *P* < 0.01)。

表 1 不同卵泡 miR-146 检测结果 ($\bar{x} \pm s$ ，*n* = 20)

类别	对照组	野生鼠 POF 组	miR-146 敲除 POF 组	<i>F</i>	<i>P</i>
原始卵泡	16.82 ± 2.11	9.43 ± 2.03 [*]	6.43 ± 1.60 ^{*#}	7.787	<0.01
初级卵泡	8.88 ± 1.12	6.15 ± 1.11 [*]	5.01 ± 1.10 ^{*#}	8.214	<0.01
次级卵泡	7.11 ± 1.34	5.11 ± 1.71 ^{*#}	4.01 ± 1.26 ^{*#}	9.726	<0.01
闭锁卵泡	7.18 ± 1.64	10.17 ± 1.41 ^{*#}	11.46 ± 1.96 ^{*#}	7.811	<0.01

注：与对照组比较 ^{*}*P* < 0.01，与野生鼠 POF 组比较 [#]*P* < 0.01。

2.3 小鼠卵巢组织炎症因子的影响 见表 2。与对照组相比，野生鼠 POF 组和 miR-146 敲除 POF 组小鼠卵巢组织 TLR4，NF-κB，TNF-α 和 IL-6 分泌显著升高 (*P* < 0.01)，同时 miR-146 敲除 POF 组显著高于野生鼠 POF 组，差异均有统计学意义 (均 *P* < 0.01)。

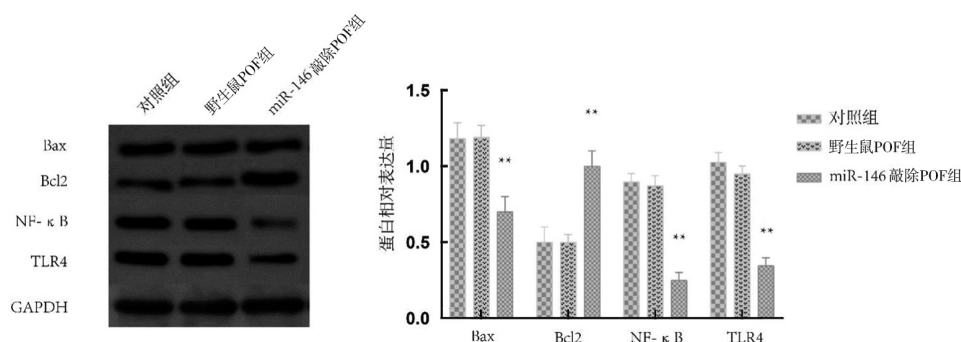
2.4 小鼠卵巢组织凋亡蛋白及 TLR4 通路蛋白表达分析 见表 3，图 1。与对照组相比，野生鼠 POF 组和 miR-146 敲除 POF 组小鼠卵巢组织 Bax 蛋白表达水平降低，Bcl2 蛋白表达升高，TLR4 和 NF-κB 表达水平降低，差异均有统计学意义 (均 *P* < 0.01)。

表2 不同小鼠卵巢组织炎症因子水平 ($\bar{x} \pm s$ pg/ml, $n=20$)

项目	对照组	野生鼠 POF 组	miR-146 敲除 POF 组	F	P
TLR4	24.81 \pm 2.81	68.18 \pm 5.92 [*]	91.11 \pm 16.34 ^{*#}	6.281	<0.01
NF- κ B	68.18 \pm 5.92	74.19 \pm 8.11 [*]	88.11 \pm 16.71 ^{*#}	7.264	<0.01
TNF- α	28.07 \pm 3.67	72.81 \pm 2.10 [*]	94.31 \pm 2.26 ^{*#}	8.724	<0.01
IL-6	19.43 \pm 10.81	69.19 \pm 7.11 [*]	81.11 \pm 16.34 ^{*#}	6.817	<0.01

注:与对照组比较^{*} $P<0.01$;与野生鼠 POF 组比较[#] $P<0.01$ 。表3 小鼠卵巢组织凋亡蛋白及 TLR4 通路蛋白表达分析 ($\bar{x} \pm s$, $n=20$)

项目	对照组	野生鼠 POF 组	miR-146 敲除 POF 组	F	P
Bax	1.81 \pm 0.21	1.18 \pm 0.19 [*]	0.61 \pm 0.14 ^{*#}	7.235	<0.01
Bcl2	0.58 \pm 0.02	0.59 \pm 0.05 [*]	0.91 \pm 0.05 ^{*#}	6.714	<0.01
NF- κ B	0.87 \pm 0.27	0.81 \pm 0.02 [*]	0.31 \pm 0.06 ^{*#}	7.737	<0.01
TLR4	1.13 \pm 0.11	1.10 \pm 0.12 [*]	0.41 \pm 0.04 ^{*#}	7.612	<0.01

注:与对照组相比^{*} $P<0.01$;与野生鼠 POF 组相比[#] $P<0.01$ 。图1 小鼠原代卵泡颗粒细胞凋亡蛋白及 TLR4 通路蛋白表达分析 (与对照组相比, $**P<0.01$)

3 讨论

POF是指卵巢功能衰竭所导致的40岁之前即闭经的现象,通常还会引起不孕、更年期和泌尿生殖道症状的妇科疾病,前激素替代疗法(HRT)是POF妇女摆脱更年期综合征最流行的选择^[11]。COULAM等^[12]总结1858例妇女的自然闭经情况,小于40岁的POF发生率为1%,小于30岁的POF发生率为1%。原发闭经中POF占10%~28%,继发闭经中POF占4%~18%。POF可能与炎症反应有显著相关性,脐带间充质干细胞(UC-MSC)移植可通过旁分泌机制发挥抗凋亡和抗炎作用,抑制IL-6和IL-1 β 表达水平,减轻化疗诱导的POF小鼠卵巢损伤,提示炎症反应的降低可能与POF的改善具有相关性,同时也有研究通过临床患者实验证实炎症因子可能作为POF患者的独立生物标志物^[13-14],根据当前的研究结果我们推测POF与炎症反应有关,可能是炎性卵巢衰老,一种卵巢慢性炎症反应伴随功能衰退。microRNA(miRNA)是一类内生的小RNA,长度约为22个核苷酸的非编码单链RNA分子,它们在动植物中参与转录后基因表达调控,并在细胞内具有多种重要的调

节作用,研究表明miR-146可以减轻小鼠POF, microRNA-146过表达通过抑制Dab2ip/Ask1/p38 Mapk通路和 γ H2A.X磷酸化减轻小鼠参与卵细胞的增殖与凋亡过程^[5];同时研究表明POF与颗粒细胞凋亡和卵泡早期闭锁密切相关,卵泡颗粒细胞发生凋亡是卵泡早期闭锁的主要原因,导致女性生殖能力的衰退^[15],在早期闭锁卵泡的颗粒细胞中Bax促凋亡蛋白大量表达,而在正常或完全闭锁卵泡中几乎不表达。由于Bax基因是人体最主要的凋亡基因,属于bcl-2基因家族,Bax/Bcl-2两蛋白之间的比例关系是决定对细胞凋亡抑制作用强弱的关键因素^[16],由此我们推测POF可能伴随着miR-146的调控。

为了证实我们推测的POF与炎症反应和凋亡有关,并且伴随着miR-146的调控,是一种由microRNA调控的卵巢慢性炎性功能衰退。本研究通过建立野生小鼠POF模型证实小鼠POF过程中miR-146表达水平显著降低,并且本研究进一步通过HE染色证实了在POF过程中,miR-146是卵巢正常功能的重要调控分子,发挥抑制POF的作用。本研究进一步通过体外实验证实了过表达miR-146

后, 原代卵母细胞凋亡相关蛋白的表达出现显著变化, 出现了抑制卵母细胞凋亡信号通路的现象, 由此可见 miR-146 可能对卵母细胞的凋亡具有一定的调控作用。Toll 样受体 (TLRs) 是参与非特异性免疫 (天然免疫) 的一类重要蛋白质分子, 炎症反应和免疫反应的重要桥梁^[17]。TLRs 可以诱导血管炎症、氧化应激和内皮功能障碍, 调控 NF- κ B 诱导白介素 (IL)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 等炎症因子的表达上调, 加重炎症反应的强度^[18], TLRs 分子存在于卵巢和生殖道, 他们在卵巢和卵泡排卵活动中发挥重要作用^[19], 我们的前期研究通过 TLR4 基因敲除小鼠发现 TLR4 与 POF 过程中的炎症反应显著相关, 炎症因子 IL-6 和 TNF- α 表达水平下调, 输卵管炎性细胞浸润, 输卵管扩张、积水等症状发生减少, 体现 TLR4 在体内细菌感染的固有免疫中起到重要作用, 介导分泌炎症因子在慢性输卵管及生殖道炎性病理演变过程导致不孕机制^[20]。本实验进一步证实 TLR4 可能是 miRNA-146 的靶基因, 并且通过 TLR4/NF- κ B 信号通路对 POF 发挥调控作用, 其机制可能与下游的炎症因子释放相关。

综上, 本研究表明 POF 与炎症反应和凋亡有关, 并且伴随着 miR-146 的调控, 是一种由 microRNA 调控的卵巢慢性炎性功能衰退, 即 miR-146 可能通过 TLR4/NF- κ B 信号通路抑制炎症反应, 降低卵泡凋亡, 对 POF 发挥保护作用。本研究可以进一步通过体外细胞及分子实验, 通过双荧光素报告实验确定 miR-146 与 TLR4 的靶向关系, 为 miR-146 在临床的应用提供理论基础。

参考文献:

- [1] KOMOROWSKA B. Autoimmune premature ovarian failure[J]. Przegląd Menopauzalny, 2016,15(4):210-214.
- [2] GHAREMANI-NASAB M, GHANBARI E, JAHANBANI Y, et al. Premature ovarian failure and tissue engineering [J]. Journal Cellular Physiological, 2020, 235(5):4217-4226.
- [3] LI Xinran, XIE Jiaxin, WANG Qingru, et al. MiR-21 and pellino-1 expression profiling in autoimmune premature ovarian insufficiency[J]. Journal Immunology Research, 2020, 2020:3582648.
- [4] YANG Meiling, LIN Li, SHA Chunli, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomal miR-144-5p improves rat ovarian function after chemotherapy-induced ovarian failure by targeting PTEN[J]. Laboratory Investigation, 2020,100(3):342-352.
- [5] LIU Te, LIN Jiajia, CHEN Chuan, et al. MicroRNA-146b-5p overexpression attenuates premature ovarian failure in mice by inhibiting the Dab2ip/Ask1/p38-Mapk pathway and γ H2A.X phosphorylation[J]. Cell Proliferation, 2021, 54(1):e12954.
- [6] DENG Taoran, HE Jing, YAO Qingyun, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells improve ovarian function in chemotherapy-induced premature ovarian failure mice through inhibiting apoptosis and inflammation via a paracrine mechanism[J]. Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.), 2021, 28(6):1718-1732.
- [7] ZHANG Cairong, ZHU Weina, TAO Wei, et al. Moxibustion against cyclophosphamide-induced premature ovarian failure in rats through inhibiting NLRP3-/Caspase-1-/GSDMD-dependent pyroptosis[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 2021: 8874757.
- [8] YANG Yijiao, YANG Ling, QI Cao, et al. Cryptotanshinone alleviates polycystic ovary syndrome in rats by regulating the HMGB1/TLR4/NF- κ B signaling pathway[J]. Molecular Medicine Reports, 2020, 22(5):3851-3861.
- [9] ZHANG Hongqin, LUO Qianqian, LU Xueyan. Effects of hPMSCs on granulosa cell apoptosis and AMH expression and their role in the restoration of ovary function in premature ovarian failure mice[J]. Stem Cell Research & Therapy, 2018, 9(1):20.
- [10] RHIM S H, DEAN J, TUNG K S, et al. Autoimmune disease of the ovary induced by a ZP3 peptide from the mouse zona pellucida[J]. Journal Clinical Investigation, 1992,89(1):28-35.
- [11] LIN Jing, LI Xuelian, SONG Hui, et al. A general description for Chinese medicine in treating premature ovarian failure[J]. Chinese Journal of Integrative Medicine, 2017, 23(2) 91-97.
- [12] COULAM C B, STERN J J. Immunology of ovarian failure[J]. Am J Reprod Immunol, 1991, 25(4): 169-174.
- [13] DENG Taoran, HE Jing, YAO Qingyun, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells improve ovarian function in chemotherapy-induced premature ovarian failure mice through inhibiting apoptosis and inflammation via a paracrine mechanism[J]. Reproductive Sciences, 2021, 28(6):1718-1732.
- [14] CEKICI Y, KILIC S, OVAYOLU A, et al. Prediction of lipoprotein-associated phospholipase A2 and inflammatory markers in subclinical atherosclerosis in premature ovarian failure patients[J]. Acta Cardiologica Sinica, 2021, 37(1):30-37.
- [15] IBRAHIM M A, ALBAHLOL I A, WANI F A, et al. Resveratrol protects against cisplatin-induced ovarian and uterine toxicity in female rats by attenuating oxidative stress, inflammation and apoptosis[J]. Chemico Biological Interactions, 2021, 338:109402.

- [16] LIU Yu, ZUO Haojiang, WANG Yao, et al. Ethanol promotes apoptosis in rat ovarian granulosa cells via the Bcl-2 family dependent intrinsic apoptotic pathway[J]. Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand, France), 2018, 64(1):118-125.
- [17] FILLATREAU S, MANFROI B, DÖRNER T. Toll-like receptor signalling in B cells during systemic lupus erythematosus [J]. Nature Reviews Rheumatology, 2021, 17(2):98-108.
- [18] SINGH G B, ZHANG Yang, BOINI K M, et al. High mobility group Box 1 mediates TMAO-induced endothelial dysfunction[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(14):3570.
- [19] XIE Yingying, ZHANG Kang, ZHANG Kai, et al. Toll-like receptors and high mobility group box 1 in granulosa cells during bovine follicle maturation[J]. Journal of Cellular Physiology, 2020, 235(23):3447-3462.
- [20] LIU Yanhui, CAI Jing, LUO Xiaoqing, et al. Collagen scaffold with human umbilical cord mesenchymal stem cells remarkably improves intrauterine adhesions in a rat model[J]. Gynecol Obstet Invest, 2020, 85(3): 267-276.

收稿日期: 2021-12-20

修回日期: 2022-12-01

(上接第76页)

- [9] WANG Bi, JIANG Xinhui, LI Yuhong, et al. YY1 alleviates lupus nephritis-induced renal injury by reducing the Th17/Treg cell ratio via the IFN- γ /Fra2 axis [J]. Laboratory Investigation, 2022, 102(8):872-884.
- [10] 中华医学会风湿病学分会, 国家皮肤与免疫疾病临床医学研究中心, 中国系统性红斑狼疮研究协作组, 等. 2020 中国系统性红斑狼疮诊疗指南 [J]. 中华内科杂志, 2020, 59(3):172-185.
Chinese Rheumatology Association, National Clinical Research Center for Dermatologic and Immunologic Diseases, Chinese Systemic Lupus Erythematosus Treatment and Research Group, et al. 2020 Chinese guidelines for the diagnosis and treatment of systemic lupus erythematosus [J]. Chinese Journal of Internal Medicine, 2020, 59(3):172-185.
- [11] 中国狼疮肾炎诊断和治疗指南编写组. 中国狼疮肾炎诊断和治疗指南 [J]. 中华医学杂志, 2019, 99 (44): 3441-3455.
Chinese Lupus Nephritis Diagnosis and Treatment Guideline Compilation Group. Chinese guidelines for the diagnosis and treatment of lupus nephritis[J]. National Medical Journal of China, 2019, 99(44):3441-3455.
- [12] DÖRNER T, FURIE R. Novel paradigms in systemic lupus erythematosus[J]. The Lancet, 2019, 393(10188):2344-2358.
- [13] MORALES E, GALINDO M, TRUJILLO H, et al. Update on lupus nephritis: Looking for a new vision[J]. Nephron, 2021, 145(1):1-13.
- [14] 杜宇, 赵佰桥, 张谊雯, 等. Th22 细胞及血清 IL-22 水平与狼疮性肾炎患者疾病活动度评分的相关性 [J]. 中国现代医学杂志, 2021, 31(22):28-32.
DU Yu, ZHAO Baiqiao, ZHANG Yiwen, et al. Correlation of Th22 cells and serum IL-22 levels with disease activity score in patients with lupus nephritis [J]. China Journal of Modern Medicine, 2021, 31(22):28-32.
- [15] 平利峰, 王晓磊, 孙凤艳, 等. 狼疮性肾炎患者血清自身免疫抗体水平变化及相关性研究 [J]. 疑难病杂志, 2019, 18(3):289-292.
PING Lifeng, WANG Xiaolei, SUN Fengyan, et al. Changes and correlation of serum autoimmune antibodies in patients with lupus nephritis [J]. Chinese Journal of Difficult and Complicated, 2019, 18(3): 289-292.
- [16] 李华锋, 莫怡浩, 曾敏, 等. 狼疮性肾炎患者血清 LRG1, ROCK2 表达与自身免疫抗体及疾病活动的相关性分析 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2021, 22(12):1067-1069.
LI Huafeng, MO Yihao, ZENG Min, et al. Correlation analysis of serum LRG1, ROCK2 expression with autoimmune antibodies and disease activity in patients with lupus nephritis[J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Nephrology, 2021, 22(12):1067-1069.
- [17] XING Yaqi, LI Ang, YANG Yang, et al. The regulation of FOXO1 and its role in disease progression[J]. Life Sciences, 2018, 193:124-131.
- [18] HUANG Fengjuan, WANG Qingzhu, GUO Feng, et al. FoxO1-mediated inhibition of STAT1 alleviates tubulointerstitial fibrosis and tubule apoptosis in diabetic kidney disease[J]. EBio Medicine, 2019, 48:491-504.
- [19] 张梦希, 董伟, 李志莲, 等. 叉头框蛋白 O1 在内毒素血症急性肾损伤中的作用 [J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(2):294-300.
ZHANG Mengxi, DONG Wei, LI Zhilian, et al. Effect of forkhead box protein O1 on endotoxin-induced acute kidney injury in renal tubular epithelial cells [J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2020, 36(2):294-300.
- [20] RAO P, PANG Min, QIAO Xi, et al. Promotion of β -catenin/Foxo1 signaling ameliorates renal interstitial fibrosis[J]. Laboratory Investigation, 2019, 99(11):1689-1701.

收稿日期: 2022-09-14

修回日期: 2022-10-17