卵巢功能减退患者卵泡液外泌体差异表达 miRNA 筛选及生物学功能分析

沈开元[1a, 2]，曲晓力[1a]，代小丽[1b]，黄　萍[1a]，邹乾兴[1a]，梁媛媛[1a]，罗平[1a, 2]（1. 柳州市人民医院 a. 生殖医学科；b. 科研科，广西柳州 545006；2. 柳州市生殖与遗传代谢性疾病重点实验室，广西柳州 545006）

摘　要：目的　筛选卵巢功能减退（diminished ovarian reserve，DOR）患者卵泡液外泌体差异表达微小核糖核酸（micro RNA，miRNA），探索其与 DOR 相关的潜在分子机制。**方法**　收集 2021 年 12 月～ 2022 年 3 月于柳州市人民医院生殖医学科辅助生殖助孕 18 例患者的卵泡液为研究样本，根据卵巢功能评估结果分为卵巢功能正常（Normal）组和卵巢功能减退（DOR）组。miRNA PCR 阵列芯片法检测两组卵泡液外泌体 miRNA 的表达，实时荧光定量聚合酶链式反应（qRT-PCR）验证芯片结果，最后通过生物信息学分析差异表达 miRNA 的靶基因及其富集的相关生物学功能和分子通路。**结果**　DOR 组筛选出 5 条差异表达 miRNA：let-7d-3p，let-7e-5p，miR-25-3p 和 miR-30c-5p 表达下调，miR-483-3p 表达上调；qRT-PCR 验证结果显示与 Normal 组比较，DOR 组 let-7d-3p，let-7e-5p，miR-25-3p 和 miR-30c-5p 表达降低，miR-483-3p 的表达升高，差异具有统计学意义（t=3.147，4.405，3.95，3.147，−3.198，均 P<0.05）；差异表达 miRNA 的靶基因主要富集于 p53 信号通路和 FoxO 信号通路，靶基因 CDKN1A, RRM2, CCND1, SESN3, MDM4, BCL2L11, SMAD4, IGF1 及 IGF1R 参与 p53 信号通路和 FoxO 信号通路，靶基因 METTL3，METTL6 及 METTL8 参与 RNA m6A 甲基化。**结论**　DOR 患者卵泡液外泌体中的差异表达 miRNA 参与 p53 和 FoxO 信号通路及 RNA m6A 甲基化的调控，是 DOR 发生机制和诊疗的潜在标靶。

关键词：PCR 阵列芯片法；卵巢功能减退；卵泡液外泌体；微小核糖核酸
中图分类号：R711.75；R392.11　**文献标识码：**A　**文章编号：**1671-7414（2023）05-017-06
doi:10.3969/**j.issn.**1671-7414.2023.05.004

Screening and Biological Function Analysis of Follicular Fluid-derived Exosomes Differentially Expressed miRNA in Patients with Diminished Ovarian Reserve

SHEN Kaiyuan[1a, 2,] QU Xiaoli[1a], DAI Xiaoli[1b], HUANG Ping[1a], ZOU Qianxing[1a], LIANG Yuanyuan[1a], LUO Ping[1a, 2]

（1a.*Reproductive Medicine Center*；1b. *Research Service Office, Liuzhou People's Hospital, Guangxi Liuzhou* 545006，*China*；2. *Liuzhou Key Laboratory of Reproductive and Genetic Metabolic Diseases, Guangxi Liuzhou* 545006，*China*）

Abstract: Objective　To conduct a screening analysis of differential micro RNA（miRNA） present in the follicular fluid exosomes in patients diagnosed with diminished ovarian reserve (DOR), and investigate the potential molecular mechanisms associated with the regulation of DOR. **Methods**　From December 2021 to March 2022, a total of 18 patients undergoing assisted reproduction at the Reproductive Medicine Center of Liuzhou People's Hospital were recruited for this study. Follicular fluid samples were collected from these patients, and they were subsequently categorized into two groups based on the evaluation results of their ovarian function: Normal group and DOR group. The miRNA PCR array was employed to identify the differential expression of miRNAs in the follicular fluid-derived exosome, which was subsequently confirmed through qRT-PCR. Additionally, bioinformatics analysis was conducted to ascertain the target genes of the differentially expressed miRNAs, as well as their enriched biological functions and molecular pathways. **Results**　Five differentially expressed miRNA were identified: let-7d-3p，let-7e-5p， miR-25-3p and miR-30c-5p were downregulated, while miR-483-3p was upregulated. Compared to

基金项目：广西自然科学基金项目（2018GXNSFBA281048）：人卵泡液外泌体对小鼠卵母细胞体外成熟及胚胎发育的影响；柳州市科技计划项目（2022SB004）：卵巢功能减退卵泡液外泌体 miRNA 靶点筛选及其对辅助生殖治疗结局相关性的研究；广西壮族自治区卫生健康委员会自筹经费科研课题（Z20180308）：人卵泡液来源外泌体对小鼠卵母细胞体外成熟影响的研究；Z20190175：不同冷冻保护剂对牛体外成熟卵母细胞玻璃化冷冻的影响；Z20200270：HBV-DNA 病毒载量对体外受精 - 胚胎移植夫妻生育力与妊娠结局的影响。

作者简介：沈开元（1986–），男，博士，主管技师，研究方向：体外受精机理和人类辅助生殖实验室技术，E-mail: sharkbaozi @163.com。

通讯作者：罗平，男，副主任技师，研究方向：人类辅助生殖实验室技术，E-mail:LUOP521@163.com。

the Normal group, the DOR group showed decreased expression of let-7d-3p，let-7e-5p，miR-25-3p and miR-30c-5p and increased expression of miR-483-3p, these differences were statistically significant (t=3.147，4.405，3.95，3.147，–3.198, all P<0.05). The differentially expressed miRNA were mainly enriched in the p53 signaling pathway and FoxO signaling pathway. Target genes CDKN1A，RRM2，CCND1，SESN3，MDM4，BCL2L11，SMAD4，IGF1 and IGF1R were involved in the p53 signaling pathway and FoxO signaling pathway, while target genes METTL3，METTL6 and METTL8 were involved in RNA m6A methylation. **Conclusion** The differentially expressed miRNA in follicular fluid-derived exosome of patients with DOR participate in the regulation of p53, FoxO signaling pathway and RNA m6A methylation, and are potential targets for the pathogenesis and diagnosis of DOR.

Keywords: PCR array chip method; ovarian dysfunction; follicular fluid derived exosomes; microRNA

卵巢功能减退（diminished ovarian reserve，DOR）患者主要表现为卵巢储备和卵母细胞质量下降，致使患者在辅助生殖技术（assisted reproductive technology，ART）治疗过程中出现卵巢低反应，卵母细胞非典型受精和胚胎着床失败等异常，最终导致周期取消率增加、怀孕率降低等 ART 不良结局的发生。卵泡发生和卵母细胞成熟是女性妊娠的关键事件，主要在卵泡液微环境中发生，因此卵泡液是了解 DOR 患者生育力下降原因的绝佳样本。此外，证据表明卵泡液外泌体中的微小核糖核酸（microRNA，miRNA）参与调控卵母细胞减数分裂恢复、卵泡闭锁凋亡以及表观遗传修饰等生物学进程[1]，对外泌体 miRNA 的研究有助于探明 DOR 发生的具体作用机制。因此，本研究利用 miRNA PCR 阵列芯片技术筛选 DOR 患者卵泡液中差异表达的外泌体 miRNA，结合生物信息学分析其潜在的分子功能和调控机制。

1 材料与方法

1.1 *研究对象* 收集 2021 年 12 月 ~ 2022 年 3 月于柳州市人民医院生殖医学科 ART 治疗患者的卵泡液，根据生育力评估检查结果将患者分为卵巢功能正常组（Normal）和卵巢功能减退组（DOR），其中入组样本 DOR 组和对照组各 9 例，分为 3 批次重复采样，每批次收集 3 例患者卵泡液样本制备为均一化样本后进行外泌体的提取。纳入标准：① Normal 组：年龄≤ 35 岁，有排卵证据，基础激素水平正常，月经第 2 ~ 3 天窦卵泡计数（antral follicle count, AFC）在 7 ~ 20 个之间，因输卵管梗阻或男方因素导致不孕；② DOR 组：符合 DOR 诊断标准[2]，年龄≤ 35 岁，有排卵证据，月经第 3 天 AFC ≤ 5 ~ 7 个、抗苗勒管激素（AMH）＜ 0.5 ~ 1.1 ng/ml，基础促卵泡激素（follicle stimulating hormone, FSH）＞ 10 U/L，患者符合其中 2 项即可纳入研究。排除标准：①并发有其他女性内外科疾病如多囊卵巢综合症、高泌乳素血症和盆腔输卵管炎症等；②存在不良生活习惯（抽烟、酗酒等）和体重超重（体重指数 BMI ≥ 25 kg/m^2）的患者。本研究已经获得柳州市人民医院医学伦理委员会批准同意 [伦理号：2020（KY-E-18-01）]，患者均知情同意。

1.2 *仪器与试剂* 离心机（5424R，德国 Eppendorf 公司），IVF 工作站（L126MP，丹麦 K-systems 公司），ZetaView 纳米颗粒跟踪分析仪（ZetaView，德国 Particle Metrix 公司），荧光定量 PCR 仪（LightCycler 480 II，瑞士 Roche 公司），外泌体提取纯化试剂盒（UR52141，上海宇玫博科技有限公司），抗 CD63 鼠源单克隆一抗（ab193349，英国 Abcam 公司），抗 TSG101 鼠源单克隆一抗（ab83，英国 Abcam 公司），卵泡液外泌体 miRNA PCR 芯片（wc-miRNA0043-H，上海沃吉基因科技有限公司），RNA 提取试剂盒（RR037A，日本 Takara 公司），逆转录试剂盒（wc-SJH0031，上海沃吉基因科技有限公司），miRNA qPCR 试剂盒（wc-SJH0004，上海沃吉基因科技有限公司）。

1.3 *方法*

1.3.1 卵泡液收集：收集取卵手术过程抽取的卵泡液，选择澄清无血染卵泡液移入 15ml 离心管中，室温条件下 3 000 r/min 离心 10 min 后将上清快速移入干净的离心管中，–20℃保存。

1.3.2 卵泡液外泌体的提取鉴定：使用外泌体提取纯化试剂盒提取纯化卵泡液外泌体，–80 ℃保存选取部分外泌体进行鉴定。外泌体鉴定使用电镜观察、蛋白免疫印迹（western blot, WB）和纳米粒子轨迹分析（nanoparticle tracking analysis, NTA）方法鉴定：①透射电镜观察外泌体形态；② WB 检测外泌体特异标记蛋白 CD63 和 TSG101 的表达；③ NTA 分析颗粒数量和直径大小分布。

1.3.3 RNA 提取和逆转录：按照试剂盒说明书步骤提取外泌体总 RNA。使用逆转录试剂盒对 RNA 进行 miRNA 的 3’ 末端加 Poly (A) 尾和逆转录，按照说明书要求配置 10μl 反应液。加尾和逆转录反应条件：42℃ 60min；酶失活：95℃ 3min。cDNA 反应液 –20℃保存备用，芯片检测和 qRT-PCR 实验前按需要稀释 10 ~ 1 000 倍后使用。

1.3.4 卵泡液外泌体 miRNA PCR 芯片检测：使用人源卵泡液外泌体 miRNA PCR 芯片（包含 90 条

卵泡液外泌体 miRNA 引物，4 个内参基因以及 2 个空白对照）进行检测。上样前芯片室温 2 000r/min 离心 20s，每块芯片需配制 cDNA 和 qPCR mix 混合液包括：miRNA PCR mix 510μl，cDNA 100μl，ddH_2O 290μl 和 Rox 染料 20μl。按每孔加 9μl 混合液进行加样，加样后透明封板膜封板，室温 2 000 r/min 离心 20s 后进行 PCR 检测，反应条件为：95℃ 预变性 30 s（1 个循环），扩增反应：95℃ 5s，60℃ 30s（40 个循环）。每组样本进行 3 次生物学重复。根据检测结果剔除未表达或 *Ct* 值 >35 的数据，差异表达倍数（expressional fold-change, FC）的计算，设定 | log2FC | >1.5 且 *P*<0.05 作为筛选差异 miRNA 的标准。

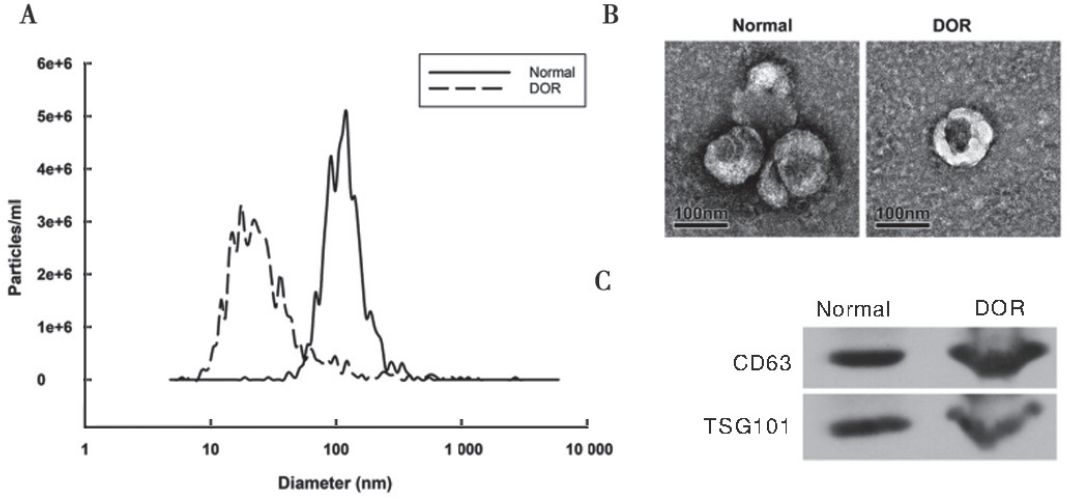
1.3.5　差异表达 miRNA qRT-PCR 验证：qRT-PCR 检测步骤按照 miRNA qPCR 试剂盒的操作说明书进行。let-7d-3p 上游引物：5’-GCGCTATACGACCTGCTGC-3’，let-7e-5p 上游引物：5’-CGCGTGAGGTAGGAGGTTGT-3’，miR-25-3p 上游引物：5’-GCGCATTGCACTTGTCTCG-3’，miR-30c-5p 上游引物：5’-GCGCGTGTAAACATCCTACACT-3’，miR-483-3p 上游引物：5’-CGCGTCACTCCTCTCCTCC-3’，通用下游引物：5’-AGTGCAGGGTCCGAGGTATT-3’；人 U6 启动子作为内参基因，上游引物：5’-CGCTTCACGAATTTGCGTGTCAT-3’，下游引物：5’-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3’。共进行至少 3 次生物学重复，每次重复至少 3 个平行检测孔。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miRNA 的相对表达量。

1.3.6　生物信息学分析：miRNA 靶基因预测使用 miRanda (http://www.microrna.org/microrna/home.do)，TargetScan (http://www.targetscan.org/) 和 miRbase (https://mirbase.org/) 数据库进行预测并取交集，剔除证据等级较低预测结果（miRNA 与 mRNA 3’-UTR 有结合验证实验视为高证据等级）。使用 DAVID 在线数据库（https://david-d.ncifcrf.gov/）对差异 miRNA 的靶基因进行基因本体论 (Gene Ontology，GO) 和京都基因与基因组百科 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG) 通路分析。GO 和 KEGG 分析使用 Fisher 精确检验，假阳性率控制使用 Bonferroni, Holm 和 false discovery rate 法对 *P* 值进行校正。

1.4　统计学分析　应用 SPSS 20.0 对两组数据资料进行独立样本 *t* 检验比较分析，*P*<0.05 为差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　卵泡液外泌体鉴定　见图 1。从卵泡液中提取的颗粒直径在 30 ~ 150 nm 之间，形态呈茶托状并表达外泌体特异蛋白 CD63 和 TSG101。

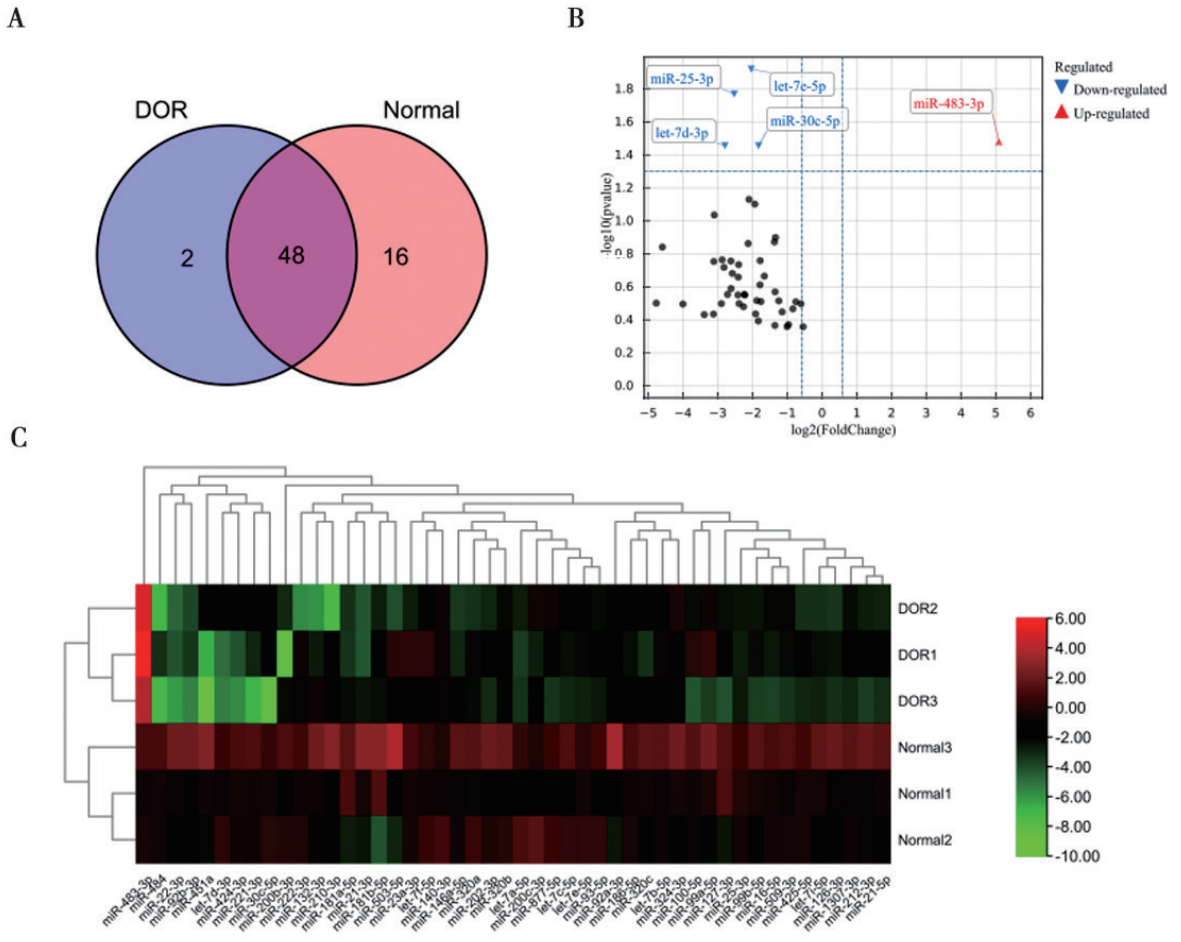


A. 纳米粒子直径分析；B. 形态学电镜观察；C. 蛋白免疫印迹

图 1　卵泡液外泌体鉴定

2.2　筛选差异表达 miRNA　从 DOR 和 Normal 两组外泌体中分别检测到 50 和 64 条 miRNA 表达，两组共表达 48 条，见图 2A。共筛选出 5 条差异 miRNA，其中 4 条表达下调：let-7d-3p，let-7e-5p，miR-25-3p 和 miR-30c-5p，1 条表达上调：miR-483-3p，见图 2B，相对表达量见表 1。共表达 miRNA 聚类分析见图 2C。

2.3　差异表达 miRNA 的 qRT-PCR 验证　见表 2。与 Normal 组比较，DOR 组 let-7d-3p，let-7e-5p，miR-25-3p 和 miR-30c-5p 表达降低，miR-483-3p 的表达升高，差异具有统计学意义（均 *P*<0.05），与芯片检测结果相符。



（A）维恩图；（B）火山图；（C）聚类热图

图 2　卵泡液外泌体 miRNA PCR 阵列芯片表达分析

表 1　差异表达 miRNA 的相对表达量

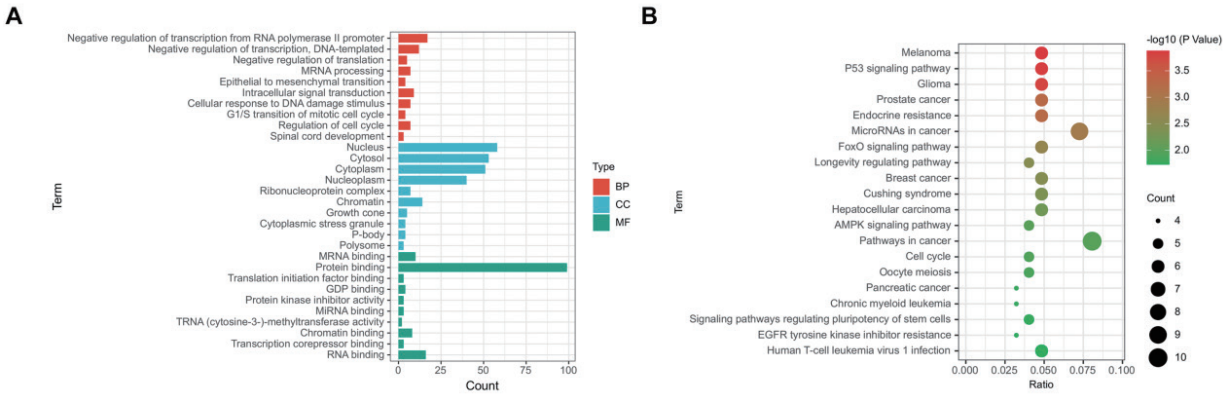
miRNA	Normal1	Normal2	Normal3	DOR1	DOR2	DOR3
let-7d-3p	−0.82	0.23	0.59	−4.9	−1.42	−5.28
let-7e-5p	−0.523 33	0.276 667	0.246 667	−2.103 33	−1.493 33	−2.803 33
miR-25-3p	−0.053 33	−0.493 33	0.546 667	−2.643 33	−2.383 33	−2.563 33
miR-30c-5p	−0.53	0.08	0.45	−1.41	−1.1	−8.23
miR-483-3p	−0.706 67	−0.386 67	1.093 333	5.693 333	5.083 333	4.023 333

注：相对表达量为 − △△ *Ct* 值。

表 2　差异表达 miRNA 在卵泡液外泌体中的表达（$\bar{x} \pm s$，n=3）

项目	Normal 组	DOR 组	t	P
let-7d-3p	1.08 ± 0.48	0.14 ± 0.06	3.147	0.035
let-7e-5p	1.03 ± 0.29	0.24 ± 0.11	4.405	0.012
miR-25-3p	1.04 ± 0.38	0.17 ± 0.02	3.950	0.017
miR-30c-5p	1.04 ± 0.34	0.28 ± 0.25	3.147	0.035
miR-483-3p	1.17 ± 0.84	33.97 ± 17.74	−3.198	0.033

2.4　GO 和 KEGG 通路富集分析　利用 DAVID 对差异表达 miRNA 的靶基因进行 GO 和 KEGG 通路富集分析。GO 分析见图 3A，结果显示靶基因主要定位于细胞核、细胞质基质以及细胞质，主要参与聚合酶 II 启动子转录的负调控 DNA 模板转录负调控以及翻译负调控等细胞生物学进程，主要参与信使 RNA 结合蛋白质结合及转录起始因子结合等分子功能。KEGG 分析见图 3B，靶基因主要富集于 p53 以及 FoxO 信号通路中，差异表达 miRNA 关键生物学功能信息见表 3。



A. 横坐标表示 GO 功能基因富集数量，不同颜色表示不同功能类型（红色：生物学进程；蓝色：细胞组成；绿色：分子功能）；B. 横坐标表示富集基因数占比，不同圆形大小表示基因数量，不同颜色代表富集的统计值转换为 -log10 的 *P* 值。

图 3　GO 和 KEGG 通路富集分析

表 3　差异表达 miRNA 关键生物学功能信息表

miRNA	靶基因	生物学功能
let-7e-5p, miR-25-3p, miR-483-3p	CDKN1A, RRM2, CCND1, SESN3, MDM4, IGF1	调控 P53 信号通路
let-7e-5p, miR-25-3p, miR-483-3p	CDKN1A, SMAD4, BCL2L11, CCND1, IGF1, IGF1R	调控 FoXO 信号通路
miR-483-3p	METTL3, METTL6, METTL8	RNA m6A 甲基化修饰

3　讨论

在 ART 治疗过程中使用低剂量激素刺激和改变体外胚胎操作流程有益于 DOR 患者卵母细胞成熟和质量提高 [3]，并且结合药物调节患者内分泌和子宫内膜容受性对提高患者妊娠率也有一定效果，然而患者的卵巢储备和卵泡发育整体质量仍与正常水平有不小的差距。研究者针对患者卵巢功能恢复进行了诸多尝试，例如线粒体注射、干细胞移植和外泌体注射等 [4]，但这些治疗方法多数处于初步研究阶段且安全性有待商榷。此外，DOR 是多因素诱发的病症，其发生涉及较多的基因和信号通路，因此深入研究 DOR 的发病机制和挖掘核心的分子靶标具有重大意义。

miRNA 是一类功能广泛存在于机体且功能复杂的非编码小 RNA，其中外泌体 miRNA 被认为是细胞间通讯的重要介质和疾病治疗的潜在候选标靶 [5]，并且患者体液中的外泌体 miRNA 在常见疾病，诸如癌症、冠心病诊断中具有较高的临床诊断价值 [6,7]。GHAFOURIAN 等 [8] 认为外泌体 miRNA 在不孕不育症诊断和治疗同样具有较大潜力。卵巢细胞中 miRNA 表达模式发生改变时有可能导致卵巢功能异常发生，有研究指出 DOR 和正常卵巢颗粒细胞中 miRNA 表达模式存在明显差异，这种表达模式在 DOR 相关的细胞存活、增殖以及激素应答过程中起到关键作用 [9]。亦有研究指出，卵泡液中外泌体 miRNA 表达变化是引起 DOR 患者卵巢储备和卵母细胞质量下降的潜在标靶 [10]。本研究发现 DOR 患者卵泡液外泌体存在差异表达的 miRNA，其中如 let-7d-3p 和 miR-30c-5p 表达下调。有研究指出 let-7d-3p 通过靶向结合 Toll 样受体 4（Toll-like receptor 4，TLR4）对卵巢颗粒细胞增殖的抑制作用参与调控卵巢功能 [11]，而 miR-30c-5p 通过 SOCS3/STAT3/VEGFA 通路促进卵巢血管生成 [12]。提示卵泡液外泌体可能通过转移 let-7d-3p 和 miR-30c-5p 调控卵巢颗粒细胞增殖和血管生成的功能参与 DOR 的发生。

卵巢储备功能和卵泡发育受到多个分子信号通路的调节，研究证实野生型 p53 诱导磷酸酶（wild-type P53-induced phosphatase 1，WIP1）的低表达会促进 WIP1-p53-Bax 信号通路介导的细胞凋亡从而加速卵巢衰老 [13]。另一项研究证明抑制 AKT-FOXO3a 以及 p-ATM/γH2AX/CHK2/p53 信号通路可以改善卵巢储备并减少卵母细胞的凋亡 [14]。亦有报道指出，FOXO1-TP53INP1 信号通路的激活会引起卵巢颗粒细胞发生 G0/G1 期阻滞从而影响卵泡发育 [15]。本研究生物信息学分析结果显示差异表达 miRNA 靶基因主要富集在 p53 和 FoxO 信号通路上，提示外泌体中差异表达 miRNA 会影响受体细胞中 p53 和 FoxO 信号通路的调节，从而引起 DOR 患者卵泡储备和发育的异常。此外，本研究还发现卵泡液外泌体中 miR-483-3p 表达上调，证据表明 miR-483-3p 能够靶向抑制甲基化转移酶 3（methyltransferase like 3， METTL3）介导的 RNA N6- 甲基腺苷（N6-methyladenosine，m6A）修饰 [16]，

抑制 METTL 3 介导的 mRNA m6A 修饰作用会阻碍卵泡发育和卵母细胞成熟[17]。这提示卵泡液外泌体 miR-483-3p 对 METTL 3 表达的抑制作用导致受体细胞中 mRNA m6A 修饰水平下降可能是引起 DOR 患者卵母细胞质量下降的潜在分子机制。

综上，我们通过 miRNA PCR 阵列芯片法发现 DOR 患者卵泡液外泌体中存在差异表达的 miRNA，其可能通过调控细胞增殖 / 凋亡相关信号通路和 RNA m6A 修饰水平参与卵巢功能减退的发生。本研究结果有望为 DOR 诊治和发生机制提供新的靶位，后续我们将进一步验证差异表达 miRNA 的临床诊断价值及作用机制。

参考文献：

[1] MARTINEZ R M, HAUSER R, LIANG Liming, et al. Urinary concentrations of phenols and phthalate metabolites reflect extracellular vesicle microRNA expression in follicular fluid [J]. Environment International, 2019, 123:20-28.

[2] PASTORE L M, CHRISTIANSON M S, STELLING J, et al. Reproductive ovarian testing and the alphabet soup of diagnoses: DOR, POI, POF, POR, and FOR[J]. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 2018, 35(1): 17-23.

[3] CEDARS M I. Managing poor ovarian response in the patient with diminished ovarian reserve[J]. Fertility and Sterility, 2022, 117(4): 655-656.

[4] HUANG Qiaoyi, CHEN Shaorong, CHEN Jiaming, et al. Therapeutic options for premature ovarian insufficiency: an updated review[J]. Reproductive Biology and Endocrinology, 2022, 20(1): 28.

[5] MORI M A, LUDWIG R G, GARCIA-MARTIN R, et al. Extracellular miRNAs: from biomarkers to mediators of physiology and disease[J]. Cell Metabolism, 2019, 30(4): 656-673.

[6] 张筱东 , 谢星星 , 李佳 , 等 , 血清外泌体 miR-221 和 miR-378 水平检测在胃癌诊断中的应用研究 [J]. 现代检验医学杂志 , 2020, 35(6): 52-55,
ZHANG Xiaodong, XIE Xingxing, LI Jia, et al. Application study of serum exosome miR-221 and miR-378 detection in the diagnosis of gastric cancer[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2020, 35(6): 52-55.

[7] 丁锦 , 贯芳 , 梁小涵 , 等 , 急性冠脉综合征患者血浆外泌体 NEAT1,miR-204 和 MMP-9 的表达水平及临床意义 [J], 现代检验医学杂志 , 2023, 38(1): 59-65,
DING Jin, GUAN Fang, LIANG Xiaohan, et al. Expression levels and clinical significance of plasma exosomal NEAT1, miR-204 and MMP-9 in patients with acute coronary syndrome[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2023, 38(1): 59-65.

[8] GHAFOURIAN M, MAHDAVI R, AKBARI JONOUSH Z, et al. The implications of exosomes in pregnancy: emerging as new diagnostic markers and therapeutics targets[J]. Cell Communication and Signaling, 2022, 20(1): 51.

[9] WOO I, CHRISTENSON L K, GUNEWARDENA S, et al. Micro-RNAs involved in cellular proliferation have altered expression profiles in granulosa of young women with diminished ovarian reserve[J]. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 2018, 35(10): 1777-1786.

[10] NEJABATI H R, ROSHANGAR L, NOURI M. Follicular fluid extracellular vesicle miRNAs and ovarian aging [J]. Clin Chim Acta, 2023, 538:29-35.

[11] WU Wei, DUAN Cuicui, LÜ Houyi, et al. MiR-let-7d-3p inhibits granulosa cell proliferation by targeting TLR4 in polycystic ovary syndrome[J]. Reproductive Toxicology, 2021, 106: 61-68.

[12] HU Jian, LIN Fangyou, YIN Yuchen, et al. Adipocyte-derived exosomal miR-30c-5p promotes ovarian angiogenesis in polycystic ovary syndrome via the SOCS3/STAT3/VEGFA pathway[J]. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2023, 230: 106278.

[13] ZHOU Su, XI Yueyue, CHEN Yingying, et al. Low WIP1 expression accelerates ovarian aging by promoting follicular atresia and primordial follicle activation[J]. Cells, 2022, 11(23): 3920.

[14] BELLUSCI G, MATTIELLO L, IANNIZZOTTO V, et al. Kinase-independent inhibition of cyclophosphamide-induced pathways protects the ovarian reserve and prolongs fertility[J]. Cell Death & Disease, 2019, 10(10): 726.

[15] LI Chengyu, LIU Zhaojun, WU Gang, et al. FOXO1 mediates hypoxia-induced G0/G1 arrest in ovarian somatic granulosa cells by activating the TP53INP1-p53-CDKN1A pathway[J]. Development, 2021, 148(14): dev199453.

[16] CHENG Lin, ZHANG Xu, HUANG Yuzhou, et al. Metformin exhibits antiproliferation activity in breast cancer via miR-483-3p/METTL3/m6A/p21 pathway[J]. Oncogenesis, 2021, 10(1): 7.

[17] MU Haiyuan, ZHANG Ting, YANG Ying, et al. METTL3-mediated mRNA N6-methyladenosine is required for oocyte and follicle development in mice[J]. Cell Death & Disease, 2021, 12(11): 989.

收稿日期：2023-03-30
修回日期：2023-07-03