

论著·基础研究

差异表达微RNA作为多囊卵巢综合征生物标志物的研究

王昱欢^{1,2}, 丁奕岑¹, 蔡瑶雨¹, 康亚妮¹

1. 上海交通大学生物医学工程学院, 上海 200240; 2. 上海交通大学医学院, 上海 200025

[摘要] **目的**·探索可作为多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 生物标志物的微RNA (microRNA, miRNA) 及其在PCOS发病机制中的生物学意义。 **方法**·选取上海交通大学医学院附属仁济医院2019年1月—10月收治的5例PCOS患者为观察组,另选取5例体检健康女性作为对照组。采集2组的颗粒细胞,用TRIzol法从中提取RNA,利用TruSeq Small RNA Library Prep试剂盒构建miRNA-seq文库,文库质检合格后用NextSeq500进行高通量测序,对测序结果进行生物信息学数据分析。采用RT-qPCR实验检验候选miRNA标志物是否存在差异表达。 **结果**·分析获得颗粒细胞中20条差异表达miRNA (均 $P<0.05$),其中miR-196a-5p、miR-10a-5p和miR-451a表达显著上调,miR-877-5p和miR-2355-5p表达显著下调,这些差异表达miRNA及其靶基因可能参与PCOS发生发展的转录调控机制。 **结论**·差异表达miRNA具有作为PCOS生物标志物的潜能,并参与PCOS的发生发展。

[关键词] 微RNA; 生物标志物; 多囊卵巢综合征; 基因表达; 靶基因

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2021.11.005 **[中图分类号]** R711.75 **[文献标志码]** A

Study on differentially expressed microRNA as a biomarker of polycystic ovary syndrome

WANG Yu-huan^{1,2}, DING Yi-cen¹, CAI Yao-yu¹, KANG Ya-ni¹

1. Shanghai Jiao Tong University School of Biomedical Engineering, Shanghai 200240, China; 2. Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

[Abstract] **Objective**·To explore microRNAs (miRNAs) as biomarkers of polycystic ovary syndrome (PCOS) and the biological significance in the pathogenesis of PCOS. **Methods**·Five patients with PCOS from January 2019 to October 2019 in Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine were selected as the observation group, and 5 healthy women were selected as the control group. Granulosa cells from 2 groups were collected and RNA was extracted by TRIzol method. TruSeq Small RNA Library Prep Kit was used to construct miRNA-Seq library. After the quality inspection of the library, NextSeq500 was used for high-throughput sequencing. Bioinformatics data analysis was performed on the sequencing results. RT-qPCR was used to verify the differential expression of candidate miRNA markers. **Results**·We finally got 20 differentially expressed miRNAs (all $P<0.05$). Among them, miR-196a-5p, miR-10a-5p and miR-451a were significantly up-regulated, while miR-877-5p and miR-2355-5p were significantly down-regulated. These differentially expressed miRNAs and their target genes may be involved in the transcriptional regulation mechanism of PCOS occurrence and development. **Conclusion**·Differentially expressed miRNAs have potential as PCOS biomarkers and are involved in the occurrence and development of PCOS.

[Key words] microRNA (miRNA); biomarker; polycystic ovary syndrome; gene expression; target gene

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 是育龄女性最常见的一种内分泌失调性疾病,以慢性无排卵 (排卵功能紊乱或丧失) 和高雄激素血症为特征,主要临床表现为月经周期不规律、不孕、多毛和痤疮。几乎半数以上的肥胖女性患有PCOS,不仅导致近期和远期的生活质量下降,还会增加癌症、心脑血管疾病的发生风险。50%~70% PCOS患者的生殖功能障碍且内分泌代谢紊乱^[1]。

微RNA (microRNAs, miRNAs) 是长度为18~25 nt的非编码小RNA,通过与靶mRNA的3'UTR区互补序列

结合,抑制其翻译或诱导其降解,从而抑制基因表达,参与多种疾病的调节,如糖尿病、胰岛素抵抗、炎症疾病和癌症等。研究^[2]表明,miRNA可能通过在PCOS患者的血液、卵泡液及颗粒细胞中异常表达,来调节生殖、激素分泌和代谢、细胞增殖和凋亡、卵巢卵泡发育相关基因,从而发挥其生物学功能,参与PCOS疾病的发生发展机制。国内外相关研究^[3]证明miR-21及miR-93在PCOS患者中表达水平异常,这可能与PCOS高雄激素表现的发病机制相关,这表明miRNA的表达水平与PCOS的发病有密切的关联性,是调节PCOS及其相关疾病的潜

[基金项目] 上海市自然科学基金 (19ZR1476100); 转化医学国家重大科技基础设施 (上海) 课题 (TMSK-2020-109); 医工交叉研究基金 (YG2019GD02, YG2019QNB23, YG2019QNA52)。

[作者简介] 王昱欢 (1999—), 女, 本科生; 电子信箱: wyh1999@sjtu.edu.cn。

[通信作者] 康亚妮, 电子信箱: kangyani@sjtu.edu.cn。

[Funding Information] Natural Science Foundation of Shanghai (19ZR1476100), National Infrastructures for Translational Medicine (Shanghai) (TMSK-2020-109), Interdisciplinary Program of Medical Engineering Cross Fund (YG2019GD02, YG2019QNB23, YG2019QNA52).

[Corresponding Author] KANG Ya-ni, E-mail: kangyani@sjtu.edu.cn.



在生物标志物。

随着对PCOS检测技术和相关分子机制研究的不断深入,基于高通量测序技术筛选PCOS相关易感基因及诊断标志物的研究也在深入展开^[4]。本研究基于高通量测序的miRNA-seq技术,从全基因组范围筛选出可作为PCOS生物标志物的miRNA,为阐明PCOS的发病机制、探求诊断新靶点提供新的思路。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选取上海交通大学医学院附属仁济医院2019年1月—10月收治的5例PCOS患者作为观察组,入选标准:符合PCOS的诊断标准,并经B超、生化检验及临床症状确诊。另选取5例体检健康的女性作为对照组。样本收集和临床信息采集均符合医院伦理委员会要求。2组对象的性别、年龄、病程等基本资料差异无统计学意义,具有可比性。

1.2 检测方法

采集2组对象的颗粒细胞,用TRIzol法分离颗粒细胞中的总RNA。使用Nanodrop One超微量分光光度计对分离得到的总RNA进行定量,之后用琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性,保证提取得到的总RNA质量较好;质检合格后按照TruSeq Small RNA Library Prep试剂盒(Illumina公司,美国)说明书步骤进行miRNA-seq文库构建,利用Qubit定量和2100生物分析仪(Agilent公司,美国)进行文库质量鉴定;文库质检合格后用NextSeq500(Illumina公司,美国)进行高通量测序;获得测序结果的原始数据后对其进行数据分析。采用RT-qPCR实验检测转录组测序结果的可靠性,同时检验候选miRNA标志物是否确实存在差异表达。

1.3 数据分析

miRNA-seq测序后获得原始数据(raw reads),经过过滤去接头,去污染、比对参考基因组,得到干净数据(clean reads)进行后续的信息分析,包括以下步骤。

(1) 使用Cutadapt(version 3.4)程序去掉原始下机数据中的接头序列。

(2) 使用Trimmomatic(version 0.39)程序去掉低质量序列,得到clean reads。

(3) 使用FastQC(version 0.11.9)程序统计clean reads的数据量,保留15~35 nt的片段进行后续分析。

(4) 使用bowtie2(version 2.1.)程序将clean reads比

对到参考基因组上,用miRDeep2(version 2.0.1.2)工具进行novel miRNA的预测。

(5) 使用bowtie2(version 2.1.)程序将clean reads比对到miRBase(version 22.1)中的known miRNA数据库上。

(6) 使用edgeR、DESeq2和limma3种方法进行基因表达差异性分析,并对差异表达miRNA进行靶基因预测。

(7) 使用clusterProfiler(release 3.13)进行基因本体数据库(Gene Ontology, GO)和京都基因和基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)富集分析。

1.4 RT-qPCR验证

设计合成miRNA的引物(表1),使用PrimeScript™ RT试剂Kit(RR037, TAKARA)进行逆转录,逆转录后利用合成的引物进行qPCR,实验重复3次,再利用Excel对实验所获得的Ct值进行计算,得出每个miRNA的 $2^{-\Delta\Delta C_t}$,利用Graph Pad Prism 7进行作图及差异分析,进一步明确可用于PCOS诊断的生物标志物。

表1 miRNA引物序列(5'→3')

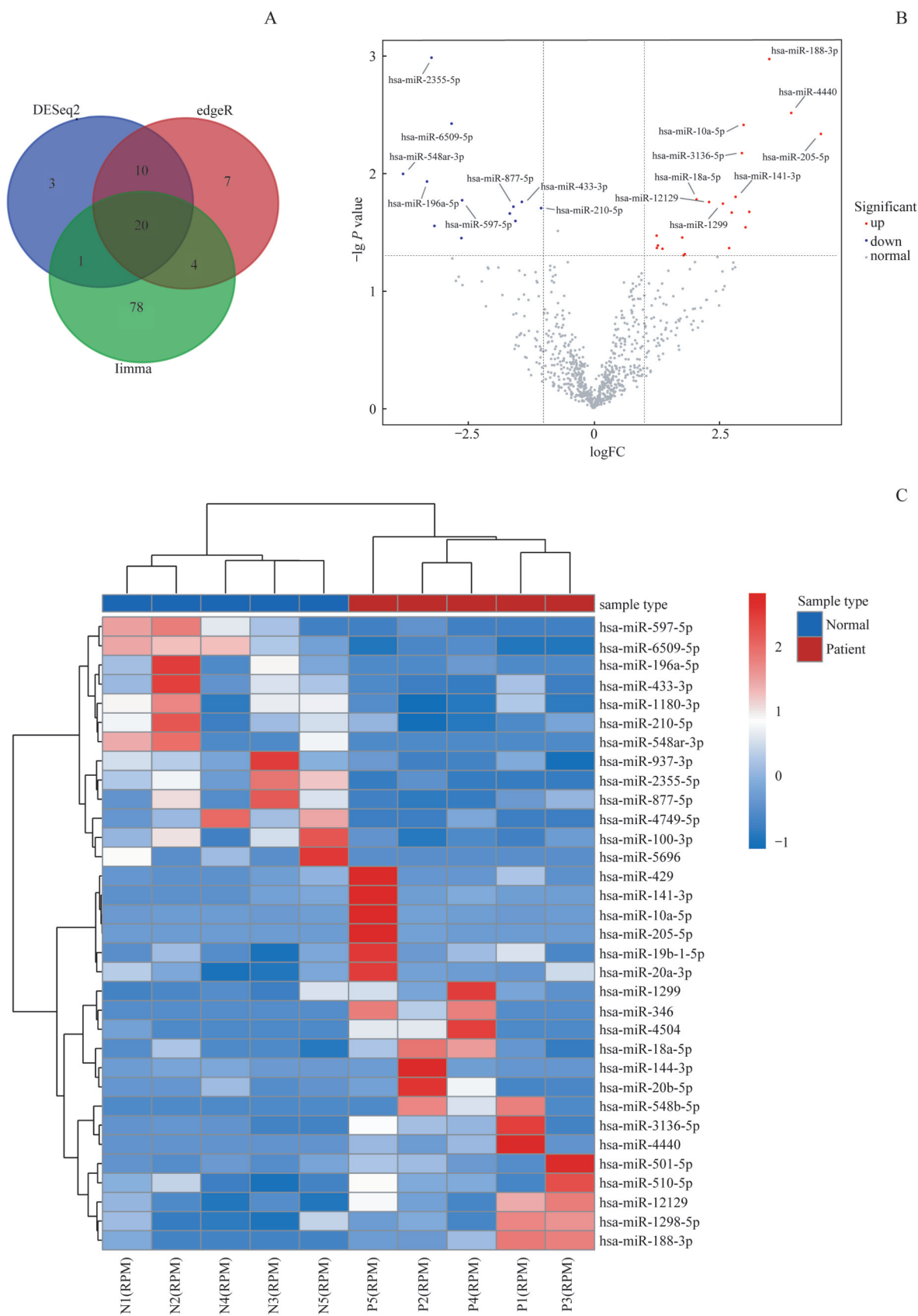
Tab 1 miRNA primer sequence(5'→3')

	Primer	Sequence 5'→3'
miRNA	hsa-miR-196a-5p	GGGTAGGTAGTTTCATGTT
	hsa-miR-10a-5p	GGGTACAGTATAGATGA
	hsa-miR-451a	GGGAAACCGTTACCATTAC
	hsa-miR-877-5p	GGGTAGAGGAGATGGC
	hsa-miR-2355-5p	GGGATCCCCAGATACAAT
	Adaptor	GATCGTCGGACTGTAGAACT

2 结果

2.1 基因表达差异分析及靶基因预测

本研究对5对样本的测序数据进行初步的质量评估后,对测序结果进行过滤、分类,并计算了miRNA的表达量,得到了5对样本中1 191条miRNA的表达量。我们进一步分别使用edgeR包、DESeq2包和limma包,对1 191条miRNA进行基因表达差异性分析,对三大R包的差异分析结果取交集,最终得到了20条表达量差异具有统计学意义的miRNA(图1A),其中包括hsa-miR-188-3p等11条表达上调miRNA和hsa-miR-2355-5p等9条表达下调miRNA(图1B)。随后,我们对差异表达的miRNA进行了层次聚类分析,分析了PCOS患者与正常女性的颗粒细胞中miRNA表达的模式差异与相似性,便于推测未知基因的功能或已知基因的新功能(图1C)。



Note: A. Intersection of edgeR, DESeq2 and limma analysis. B. Volcano map of differential analysis. C. Hierarchical clustering heatmap of miRNA with differential expression.

图1 miRNA 差异分析的结果

Fig 1 Results of miRNA differential analysis

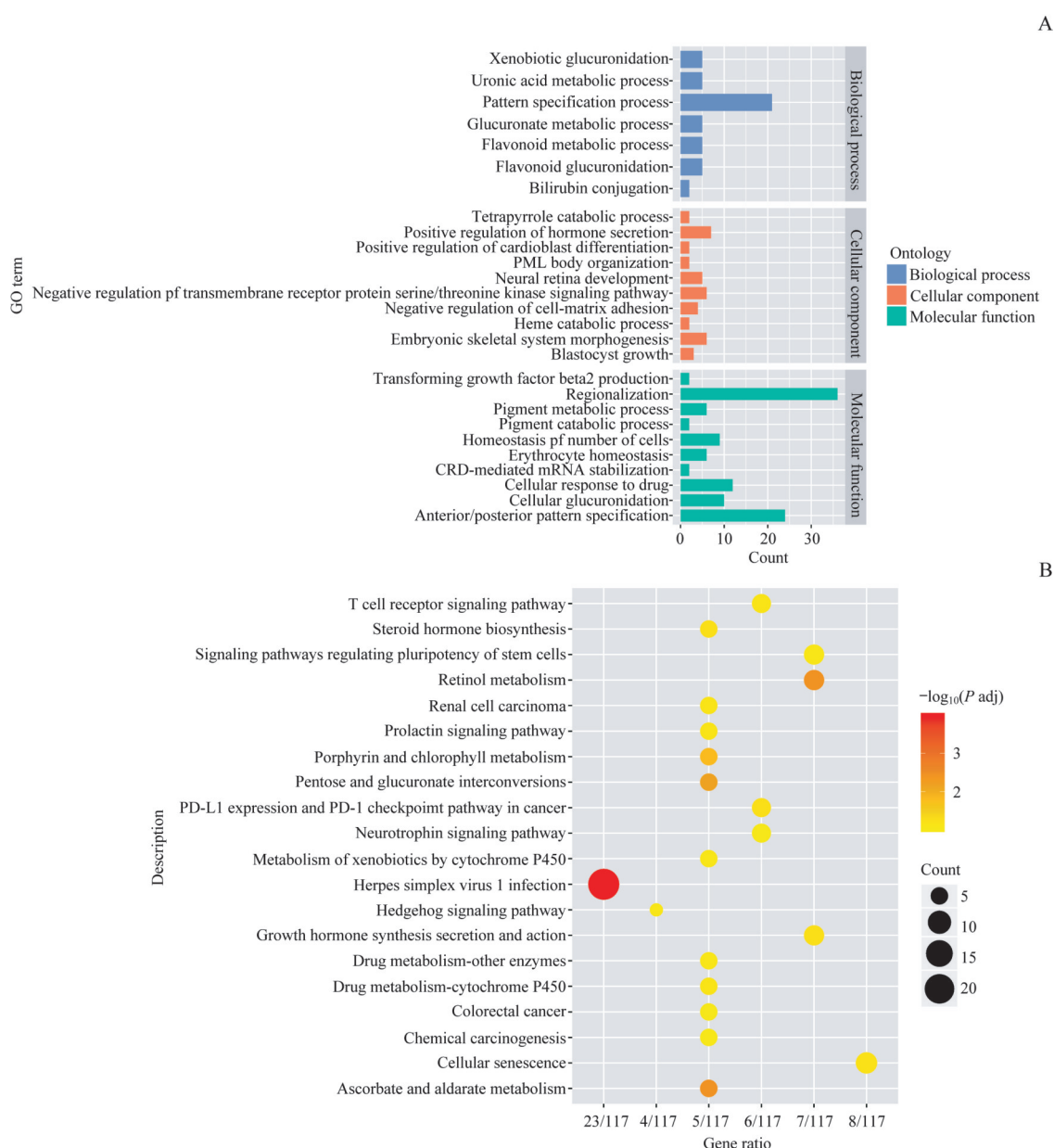


2.2 靶基因预测及功能富集分析

通过对20条差异表达miRNA进一步筛选,选取 $P < 0.02$ 的13条miRNA和表达量差异倍数超过8倍的11条miRNA,取两者交集,获得了9条miRNA作为候选生物标志物,其中hsa-miR-10a-5p、hsa-miR-1299、hsa-miR-4440、hsa-miR-451a、hsa-miR-196a-5p和hsa-miR-188-3p为表达上调基因,hsa-miR-2355-5p、hsa-miR-6509-5p和hsa-miR-877-5p为表达下调基因。

为了探究差异表达miRNA在PCOS颗粒细胞中的调控作用,分别使用数据库mirDB和TargetScan对这9条候选生物标志物miRNA进行靶基因预测,并将2个数据库

的靶基因预测结果取交集,得到最终的靶基因预测结果。随后,使用ClusterProfiler包对靶基因进行了GO富集分析和KEGG富集分析,进一步探究显著差异表达miRNA在PCOS发病机制中的生物学意义。根据GO富集分析结果表明,候选生物标志物miRNA的靶基因集合富集于上皮细胞增殖及其调节、细胞黏附的正调控、腺发育等,其中主要集中于上皮细胞增殖的调节(图2A)。KEGG富集分析结果表明,差异表达miRNA的靶基因主要富集于T细胞受体信号通路、类固醇激素生物合成、调节多功能干细胞信号通路、泌乳素信号通路和视黄醇代谢等通路(图2B)。



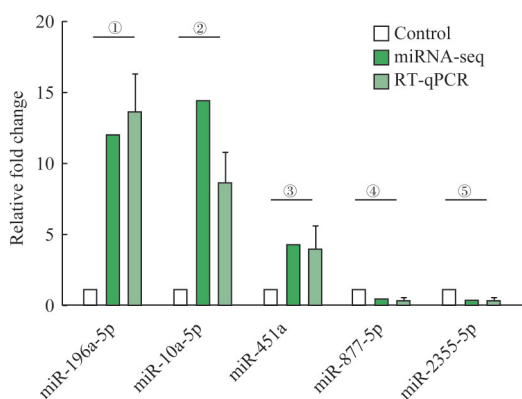
Note: A. GO enrichment analysis. B. KEGG enrichment analysis.

图2 靶基因的功能富集分析结果

Fig 2 Results of functional enrichment analysis of target genes

2.3 RT-qPCR实验验证

基于miRNA-Seq数据处理后得到的基因表达信息,在显著性差异表达的miRNA中随机挑选5个基因(3个上调,2个下调,即miR-196a-5p、miR-877-5p、miR-2355-5p、miR-10a-5p和miR-451a)设计引物,然后利用qRT-PCR实验对PCOS组与对照组临床样本进行了检测验证。结果如图3所示,5个miRNA的qRT-PCR结果与测序数据分析结果高度一致,说明转录组测序结果的可靠性。同时,miR-196a-5p ($P=0.005$)、miR-10a-5p ($P=0.009$)、miR-877-5p ($P=0.002$)、miR-2355-5p ($P=0.008$)、miR-451a ($P=0.041$),5条miRNA的表达差异均具有统计学意义,表明这5条miRNA具有作为PCOS生物标志物的潜能。



Note: ① $P=0.005$, ② $P=0.009$, ③ $P=0.041$, ④ $P=0.002$, ⑤ $P=0.008$.

图3 利用RT-qPCR实验验证5个miRNA候选生物标志物的基因表达结果

Fig 3 RT-qPCR validation of 5 miRNA candidate markers

3 讨论

PCOS是育龄妇女常见的内分泌系统疾病,是引起不孕不育的主要原因。临床上针对PCOS的诊断依然依赖于其诊断标准,与PCOS相关的易感基因及诊断生物标志物仍有待研究。研究^[3,5-7]表明,多种miRNA参与了PCOS疾病的发生和发展过程。miRNA的异常表达被认为可能参与PCOS的基本病理生理过程,包括细胞增殖、胰岛素抵抗、雌激素分泌、雄激素生成和细胞凋亡等^[2]。本研究利用基于高通量测序的miRNA(miRNA-seq)技术,通过生物信息学方法筛选分析了与PCOS有关的miRNA作为生物标志物。经分析证明颗粒细胞中miR-196a-5p、miR-877-5p、miR-2355-5p、miR-10a-5p和miR-451a表达差异具有统计学意义,RT-qPCR实验结果表明筛选出的miRNA具有作为PCOS生物标志物的潜能。

miR-196a-5p是一种新报道的与多种肿瘤相关的miRNA^[8-10]。Zhao等^[11]的研究发现,miR-196a-5p会被长链非编码RNA(long noncoding RNA, lncRNA) *GAS5*

直接靶向调控,从而抑制卵巢癌的发展。PCOS是一种复杂的内分泌疾病,患有PCOS的女性新陈代谢和激素环境改变可能会增加其罹患某些类型癌症的风险。而一些研究与统计调查发现,在某些患有PCOS的女性中,卵巢癌的发病率也可能上升^[12-13],PCOS患者与卵巢癌患者之间也存在一些相同的症状,如月经不调、少经等。但PCOS与卵巢癌之间的关联非常复杂,目前尚不清楚^[14-15]。

关于miR-877-5p的研究目前主要集中在肿瘤领域,而其与PCOS疾病的相关性还有待研究。Yan等^[16]发现,miR-877-5p通过靶向*CDK14*抑制细胞生长、迁移和侵袭,在肝细胞癌细胞中起到抑癌作用。正常情况下,女性每个月卵巢有1~2个卵泡发育成熟、排卵,之后形成黄体,卵泡闭锁,而PCOS患者的卵泡不能发育成熟,卵巢内聚集多个小的卵泡,所以卵巢呈现多囊改变。Yan等^[16]的研究发现miR-877-5p可以通过靶向*CDK14*抑制细胞生长,但*CDK14*是否会影响卵巢中卵泡的发育还有待研究。

目前关于miR-2355-5p的研究较少。现有的一些研究表明,miR-2355-5p不仅与癌症的发展相关^[17-18],还与慢性疾病的发生相关。Iacomino等^[19]发现了3条循环miRNA有作为肥胖和相关代谢紊乱的新型生物标志物的可能性,miR-2355-5p便是其中1条;而肥胖和相关代谢紊乱也是PCOS患者可能出现的症状,这预示着miR-2355-5p也具有作为PCOS诊断生物标志物的潜能。

Wang等^[20]发现miR-10a-5p在卵巢癌患者的血浆中显著过表达,可以作为卵巢癌非侵入性诊断生物标志物;而Guo等^[21]发现miR-10a-5p的基因组扩增和低表达促进卵巢癌细胞的增殖和侵袭。这些研究表明miR-10a-5p与卵巢癌的发生发展有关,预示了miR-10a-5p与PCOS之间可能存在联系。此外,有研究^[22]表明,miR-10a-5p的mRNA基因靶标与结缔组织增殖显著相关,猪卵泡中的miR-10a-5p可以调节结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)^[23],而CTGF在PCOS的卵泡发育障碍及排卵障碍过程中发挥重要作用,可能和胰岛素样生长因子1(insulin-like growth factor 1, IGF-1)协同作用促使PCOS发生^[24]。这些证据表明,miR-10a-5p可能参与了PCOS的发生发展。

miR-451a被认为在多种肿瘤中发挥作用。在宫颈癌中,有研究^[25]表明miR-451a在宫颈癌样本中下调,并可能通过调节PI3K-Akt信号通路和*EREG*参与宫颈癌的发生发展,但一些研究^[12]表明PCOS与宫颈癌之间并不存在明显关联。此外,Díaz等^[26]针对患有PCOS的31例青春期的女孩展开了PCOS诊断生物标志物的研究,他们发现miR-451a对于诊断PCOS具有100%的敏感度和特异

度, 可以作为青春期PCOS诊断和治疗的生物标志物。

总结以上讨论内容, 我们发现 miR-196a-5p 和 miR-10a-5p 均与卵巢癌的发病相关, 且 miR-10a-5p 可通过调控 *CTGF* 促使 PCOS 发生, miR-2355-5p 和 miR-451a 都具有作为 PCOS 及其相关复杂疾病的诊断生物标志物的潜能, 而 miR-877-5p 也可能与 PCOS 的发生发展有关。GO 和 KEGG 富集分析结果表明, miR-196a-5p、miR-877-5p、miR-10a-5p 和 miR-451a 与细胞的生长、增殖和凋亡有关, miR-2355-5p 则与激素分泌与代谢紊乱相关, miR-196a-5p、miR-877-5p、miR-2355-5p、miR-10a-5p 和 miR-451a 均可能通过影响相关基因的表达, 参与信号通路的调控, 从而影响 PCOS 的发生发展。

研究表明, 过量的雄激素会引起 PCOS 的发生^[27],

而视黄醇会引起氧化应激 (oxidation stress, OS) 水平的失衡, 从而产生过多的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 自由基, 并最终导致胰岛素抵抗^[28-31]。胰岛素会增强人体内黄体生成素 (luteinizing hormone, LH) 对雄激素分泌过程的刺激作用^[32-33], 促使雄激素水平升高并产生一系列 PCOS 表型。在本研究中, 我们发现 miR-2355-5p 的靶基因 *DHRS4* 和 *DHRS4L2* 通过视黄醇代谢通路引起 OS 失衡, 间接导致雄激素水平增加与 PCOS 的发生; 我们还发现 miR-188-3p/*MAPK13*、miR-196a-5p/*NRAS* 和 miR-4440/*GSK3B* 均通过催乳素信号通路促进胰岛素分泌, 导致体内 LH 水平上升并最终产生 PCOS 表型。我们对本研究所发现的 PCOS 疾病发生发展的转录调控机制进行了总结, 见图 4。

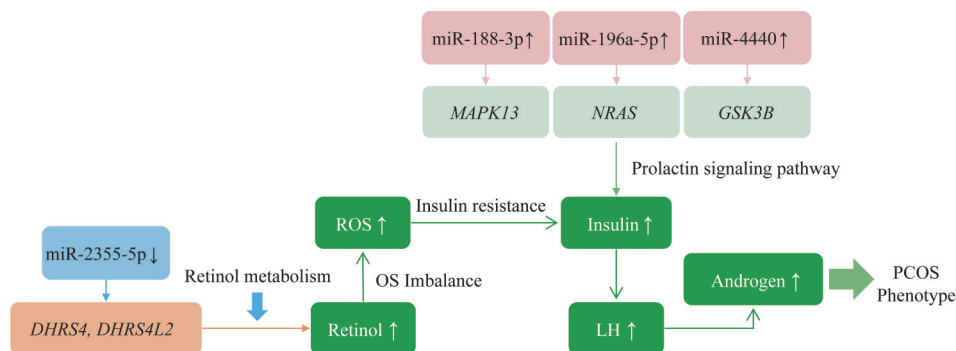


图4 PCOS疾病发生发展的转录调控机制

Fig 4 Transcriptional regulatory mechanism of PCOS occurrence and development

本研究利用基于高通量测序的 miRNA-seq 技术, 从全基因组范围进行了颗粒细胞 miRNA 作为 PCOS 疾病生物标志物的研究, 建立了 PCOS 疾病 miRNA 表达谱, 并通过计算预测与实验验证分析了特异性差异表达的 miRNA 及其靶基因, 证明了颗粒细胞中 miR-196a-5p、miR-877-5p、miR-2355-5p、miR-10a-5p 和 miR-451a 具有

作为 PCOS 生物标志物的潜能。通过对差异表达 miRNA 的靶基因进行功能富集分析, 在全基因组水平初步探索了 PCOS 疾病的发生机制, 探究了 miRNA 在 PCOS 发病机制中的生物学意义, 总结出了 PCOS 疾病发生发展的转录调控机制, 为阐明 PCOS 的发病机制、探求诊断新靶点提供了研究思路 and 理论依据。

参·考·文·献

- [1] Nandi A, Chen ZJ, Patel R, et al. Polycystic ovary syndrome[J]. Endocrinol Metab Clin N Am, 2014, 43(1): 123-147.
- [2] Zununi Vahed S, Nakhjavani M, Etemadi J, et al. Altered levels of immune-regulatory microRNAs in plasma samples of patients with lupus nephritis[J]. BioImpacts, 2018, 8(3): 177-183.
- [3] Závěský L, Jandáková E, Weinberger V, et al. Ovarian cancer: differentially expressed microRNAs in tumor tissue and cell-free ascitic fluid as potential novel biomarkers[J]. Cancer Invest, 2019, 37(9): 440-452.
- [4] Jiang JJ, Gao SS, Zhang Y. Therapeutic effects of dimethyldiguanide combined with clomifene citrate in the treatment of polycystic ovary syndrome[J]. Revista Da Assoc Med Brasileira 1992, 2019, 65(9): 1144-1150.
- [5] Chen Z, Ou H, Wu H, et al. Role of microRNA in the pathogenesis of polycystic ovary syndrome[J]. DNA Cell Biol, 2019, 38(8): 754-762.
- [6] Concha CF, Sir PT, Recabarren SE, et al. Epigenetics of polycystic ovary syndrome[J]. Rev Med Chil, 2017, 145(7): 907-915.
- [7] Legro RS, Arslanian SA, Ehrmann DA, et al. Diagnosis and treatment of polycystic ovary syndrome: an Endocrine Society clinical practice guideline[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2013, 98(12): 4565-4592.
- [8] Xin H, Wang C, Liu Z. miR-196a-5p promotes metastasis of colorectal cancer via targeting IκBα[J]. BMC Cancer, 2019, 19(1): 30.
- [9] Pan Y, Shu X, Sun L, et al. miR-196a-5p modulates gastric cancer stem cell characteristics by targeting Smad4[J]. Int J Oncol, 2017, 50(6): 1965-1976.
- [10] Bao M, Pan S, Yang W, et al. Serum miR-10a-5p and miR-196a-5p as non-invasive biomarkers in non-small cell lung cancer[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2018, 11(2): 773-780.
- [11] Zhao H, Yu H, Zheng J, et al. Lowly-expressed lncRNA GAS5 facilitates progression of ovarian cancer through targeting miR-196-5p and thereby regulating HOXA5[J]. Gynecol Oncol, 2018, 151(2): 345-355.
- [12] Dumesic DA, Lobo RA. Cancer risk and PCOS[J]. Steroids, 2013, 78(8): 782-785.
- [13] Harris HR, Babic A, Webb PM, et al. Polycystic ovary syndrome, oligomenorrhea, and risk of ovarian cancer histotypes: evidence from the Ovarian Cancer Association Consortium[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2013, 22(12): 2155-2162.

- 2018, 27(2):174-182.
- [14] Harris HR, Terry KL. Polycystic ovary syndrome and risk of endometrial, ovarian, and breast cancer: a systematic review[J]. *Fertil Res Pract*, 2016, 2: 14.
- [15] Jiao J, Sagnelli M, Shi B, et al. Genetic and epigenetic characteristics in ovarian tissues from polycystic ovary syndrome patients with irregular menstruation resemble those of ovarian cancer[J]. *BMC Endocr Disord*, 2019, 19(1): 30.
- [16] Yan TH, Qiu C, Sun J, et al. miR-877-5p suppresses cell growth, migration and invasion by targeting cyclin dependent kinase 14 and predicts prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(10): 3038-3046.
- [17] Cheng C, Zhang ZC, Cheng FL, et al. Exosomal lncRNA RAMP2-AS1 derived from chondrosarcoma cells promotes angiogenesis through miR-2355-5p/VEGFR2 axis[J]. *Oncotargets Ther*, 2020, 13: 3291-3301.
- [18] Zhang Q, Guan F, Fan T, et al. LncRNA WDFY3-AS2 suppresses proliferation and invasion in oesophageal squamous cell carcinoma by regulating miR-2355-5p/SOCS2 axis[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(14): 8206-8220.
- [19] Iacomino G, Russo P, Stillitano I, et al. Circulating microRNAs are deregulated in overweight/obese children: preliminary results of the I . Family study[J]. *Genes Nutr*, 2016, 11(1): 1-9.
- [20] Wang W, Yin Y, Shan X, et al. The value of plasma-based MicroRNAs as diagnostic biomarkers for ovarian cancer[J]. *Am J Med Sci*, 2019, 358(4): 256-267.
- [21] Guo L, Li YW, Zhao C, et al. RECQL4, negatively regulated by miR-10a-5p, facilitates cell proliferation and invasion via MAFB in ovarian cancer[J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 524128.
- [22] Zota AR, Geller RJ, VanNoy BN, et al. Phthalate exposures and microRNA expression in uterine fibroids: the FORGE study[J]. *Epigenetics Insights*, 2020, 13: 2516865720904057.
- [23] Guo T, Zhang J, Yao W, et al. CircINHA resists granulosa cell apoptosis by upregulating CTGF as a CeRNA of miR-10a-5p in pig ovarian follicles[J]. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 2019, 1862(10): 194420.
- [24] 刘宏改, 张展. 结缔组织生长因子和多囊卵巢综合征的关系[J]. *河南医学研究*, 2007, 16(2): 189-192.
- [25] Zong S, Liu X, Zhou N, et al. E2F7, EREG, miR-451a and miR-106b-5p are associated with the cervical cancer development[J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2019, 299(4): 1089-1098.
- [26] Díaz M, Bassols J, López-Bermejo A, et al. Low circulating levels of miR-451a in girls with polycystic ovary syndrome: different effects of randomized treatments[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2020, 105(3): e273-e281.
- [27] Legro RS, Feingold KR, Anawalt B, et al. Evaluation and treatment of polycystic ovary syndrome[J]. *Practice*, 2000, 17(3):82-85.
- [28] 梅玲蔚, 熊正爱. 氧化应激与多囊卵巢综合征的研究进展[J]. *广东医学*, 2014, 35(8): 1282-1284.
- [29] Wickenheisser JK, Nelson-DeGrave VL, Hendricks KL, et al. Retinoids and retinol differentially regulate steroid biosynthesis in ovarian theca cells isolated from normal cycling women and women with polycystic ovary syndrome[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90(8): 4858-4865.
- [30] 王虎生, 阮祥燕, 李扬璐, 等. 丙二醛、视黄醇与多囊卵巢综合征发病机制关系的探索[J]. *首都医科大学学报*, 2018, 39(4): 512-516.
- [31] Dal-Pizzol F, Klamt F, Benfato MS, et al. Retinol supplementation induces oxidative stress and modulates antioxidant enzyme activities in rat sertoli cells[J]. *Free Radic Res*, 2001, 34(4): 395-404.
- [32] Baillargeon JP, Nestler JE. Commentary: polycystic ovary syndrome: a syndrome of ovarian hypersensitivity to insulin? [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006, 91(1): 22-24.
- [33] Baillargeon JP, Carpentier A. Role of insulin in the hyperandrogenemia of lean women with polycystic ovary syndrome and normal insulin sensitivity[J]. *Fertil Steril*, 2007, 88(4): 886-893.

[收稿日期] 2021-05-26

[本文编辑] 徐 敏