

论著·基础研究

微RNA-30b-5p通过靶向Atg5抑制多囊卵巢综合征大鼠卵巢颗粒细胞自噬

王雪敏¹, 王亚楠², 牛爱琴¹, 叶英¹, 李飞¹

1. 河南省商丘市第一人民医院生殖医学中心, 商丘 476005; 2. 郑州大学第三附属医院妇产科, 郑州 450014

[摘要] **目的**·探究 microRNA-30b-5p (miR-30b-5p) 在多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 大鼠中的表达及 miR-30b-5p 过表达对卵巢颗粒细胞 (granulosa cell, GC) 自噬的影响。**方法**·采用脱氢表雄酮 (dehydroepiandrosterone, DHEA) 建立 PCOS 大鼠模型, 实时荧光定量 PCR (real-time fluorescent quantitative PCR, qRT-PCR) 和 Western blotting 检测正常组和 PCOS 组大鼠卵巢组织中 miR-30b-5p 和自噬相关蛋白 5 同源物 (autophagy-associated protein 5 homologue, Atg5) 的表达。分离并培养原代 PCOS 大鼠卵巢 GC, 分为对照组、miR-NC 组、miR-30b-5p 过表达组、miR-30b-5p 过表达+pcDNA3.1-NC 组、miR-30b-5p 过表达+pcDNA3.1-Atg5 组, 另取正常组大鼠卵巢 GC 为空白组; 将 miR-30b-5p mimic 和 pcDNA3.1-Atg5 及相应的阴性对照转染到细胞中, 转染 48 h 后, qRT-PCR 检测各组细胞中 miR-30b-5p 和 Atg5 mRNA 表达, 验证转染效果。CCK-8 及流式细胞仪分别检测细胞活力和凋亡率; 免疫荧光染色检测各组细胞微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3) 阳性表达; Western blotting 检测自噬相关蛋白 Atg5、p62、Beclin-1 和 LC3 蛋白表达。**结果**·PCOS 组大鼠卵巢组织中 miR-30b-5p 表达水平显著低于正常组, Atg5 mRNA 和蛋白水平显著高于正常组 (均 $P=0.000$)。转染后, 与空白组相比, 对照组卵巢 GC 中 miR-30b-5p 水平、细胞凋亡率、p62 蛋白水平显著降低, Atg5 mRNA 和蛋白水平、细胞增殖活性、LC3 阳性细胞百分比、Beclin-1 蛋白水平和 LC3II/LC3I 比值显著升高 (均 $P=0.000$); 与对照组相比, miR-30b-5p 过表达组卵巢 GC 中 miR-30b-5p 水平、细胞凋亡率、p62 蛋白水平显著升高, Atg5 mRNA 和蛋白水平、细胞增殖活性、LC3 阳性细胞百分比、Beclin-1 蛋白水平和 LC3II/LC3I 比值显著降低 (均 $P=0.000$)。上调 Atg5 可明显减弱 miR-30b-5p 过表达对卵巢 GC 增殖和自噬的抑制作用 (均 $P=0.000$)。**结论**·MiR-30b-5p 在 PCOS 中呈低表达; 过表达 miR-30b-5p 可抑制 PCOS 大鼠卵巢 GC 增殖和自噬, 促进细胞凋亡, 其作用机制可能与抑制 Atg5 表达有关。

[关键词] 多囊卵巢综合征; microRNA-30b-5p; 自噬; 自噬相关蛋白 5 同源物; 增殖; 凋亡

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2023.01.003 **[中图分类号]** R711.75 **[文献标志码]** A

MicroRNA-30b-5p inhibits autophagy in ovarian granulosa cells in polycystic ovary syndrome rats by targeting Atg5

WANG Xuemin¹, WANG Yanan², NIU Aiqin¹, YE Ying¹, LI Fei¹

1. Reproductive Medicine Center, Shangqiu First People's Hospital, Henan Province, Shangqiu 476005, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, China

[Abstract] **Objective**·To explore the expression of microRNA-30b-5p (miR-30b-5p) in polycystic ovary syndrome (PCOS) rats and the effect of miR-30b-5p overexpression on ovarian granulosa cell (GC) autophagy. **Methods**·Dehydroepiandrosterone (DHEA) was performed to establish a PCOS rat model, and real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR) and Western blotting were performed to measure the expression of miR-30b-5p and autophagy-associated protein 5 homologue (Atg5) in the ovarian tissues of the normal group and PCOS group. Primary PCOS rat ovarian GCs were isolated and cultured, and divided into control group, miR-NC group, miR-30b-5p overexpression group, miR-30b-5p overexpression+pcDNA3.1-NC group, and miR-30b-5p overexpression+pcDNA3.1-Atg5 group. In addition, the ovarian GC of the normal group was taken as the blank group. MiR-30b-5p mimic, pcDNA3.1-Atg5 and the corresponding negative control were transfected into the cells, and 48 h after transfection, qRT-PCR was performed to measure the expression of miR-30b-5p and Atg5 mRNA of cells in each group to verify the transfection effect. CCK-8 and flow cytometer were performed to measure cell viability and apoptosis rate, respectively; immunofluorescence staining

[基金项目] 2020 年河南省医学科技攻关计划联合共建项目 (LHGJ20200933)。

[作者简介] 王雪敏 (1987—), 女, 主治医师, 硕士; 电子邮箱: wonder7878@163.com。

[通信作者] 同上。

[Funding Information] 2020 Henan Medical Science and Technology Research Plan Joint Construction Project (LHGJ20200933)。

[Corresponding Author] WANG Xuemin, E-mail: wonder7878@163.com。

[网络首发] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2045.R.20230114.1656.004.html> (2023/1/16 16:12:48)。



was performed to measure the positive expression of microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) in each group. Western blotting was performed to measure the protein expression of autophagy-related proteins Atg5, p62, Beclin-1 and LC3. **Results** The expression level of miR-30b-5p in the ovarian tissue of the PCOS group was significantly lower than that of the normal group, and the levels of *Atg5* mRNA and protein were significantly higher than those of the normal group (all $P=0.000$). After transfection, compared with the blank group, the miR-30b-5p level, apoptosis rate, and p62 protein level in the ovarian GC of the control group were significantly reduced, the *Atg5* mRNA and protein levels, cell proliferation activity, LC3 positive cell percentage, Beclin-1 protein level and LC3II/LC3I ratio were significantly increased (all $P=0.000$). Compared with the control group, the miR-30b-5p level, apoptosis rate, and p62 protein level in the ovarian GC of the miR-30b-5p overexpression group were significantly increased, and the *Atg5* mRNA and protein levels, cell proliferation activity, LC3 positive cell percentage, Beclin-1 protein level and LC3II/LC3I ratio were significantly reduced (all $P=0.000$). Up-regulation of Atg5 can significantly attenuate the inhibitory effect of miR-30b-5p overexpression on ovarian GC proliferation and autophagy (all $P=0.000$). **Conclusion** MiR-30b-5p is lowly expressed in PCOS; overexpression of miR-30b-5p can inhibit the proliferation and autophagy of ovarian GC in PCOS rats, and promote cell apoptosis, and its mechanism may be related to the inhibition of Atg5 expression.

[Key words] polycystic ovary syndrome; microRNA-30b-5p; autophagy; autophagy-associated protein 5 homologue(Atg5); proliferation; apoptosis

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 是内分泌代谢紊乱性疾病之一, 在育龄妇女中非常普遍^[1]。尽管越来越多的证据表明环境和遗传因素都与PCOS的发病相关, 但在分子水平上PCOS的病因仍不清楚。颗粒细胞 (granular cell, GC) 是卵泡发生过程中必不可少的, 在卵巢卵泡发育过程中, GC增殖并逐渐分化以支持卵母细胞成熟和排卵^[2]。卵巢GC过度自噬可能导致PCOS的发生。据报道^[3-4], PCOS患者卵巢GC中自噬相关蛋白5同源物 (autophagy associated protein 5 homologue, *Atg5*)、*Atg7*、*Beclin-1*的mRNA水平和自噬标志蛋白微管相关蛋白1轻链3 II (microtubule-associated protein 1 light chain 3 II, LC3II)/LC3I比率显著增加。在PCOS大鼠的卵巢组织中也可观察到自噬增强, 且GC增殖增加^[5]。通过抑制自噬来抑制卵巢GC的增殖, 并促进凋亡, 可改善PCOS^[6]。因此, 抑制卵巢GC自噬异常激活的方法可能为PCOS提供新的治疗策略。

微RNA (microRNA, miRNA) 通过与特定信使RNA (mRNA) 的3'-非翻译区 (untranslated region, UTR) 结合来负调控mRNA稳定性和/或抑制mRNA翻译。最近的研究表明miRNA在PCOS的病理生理过程中发挥着重要作用^[7], 并参与卵巢GC自噬与凋亡的调节^[8]。miR-30b-5p是一种已知的可抑制溶酶体生物发生和自噬的miRNA^[9]; 下调miR-30b-5p可促进Atg5和Beclin-1表达, 从而激活自噬^[10]。通过Starbase v2.0 (<http://starbase.sysu.edu.cn/index.php>) 数据库预测到miR-30b-5p与*Atg5*的3'-UTR存在互补序列, 即miR-30b-5p是*Atg5*的潜在靶向调节因子。

此外, 有研究证实*Atg5*是miR-30b-5p的靶标^[11]。然而, miR-30b-5p在PCOS发病中的作用及机制尚不清楚。因此, 本研究旨在探讨miR-30b-5p在PCOS中的表达及其对卵巢GC自噬的影响, 并分析其潜在机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级雌性SD大鼠30只, 6周龄, 体质量(180±20)g, 购自中国科学院上海药物研究所, 生产许可证号为SCXK(沪)2020-0005; 所有大鼠饲养在郑州大学实验动物中心, 使用许可证号为SYXK(豫)2020-0008。饲养温度(23±2)℃, 湿度(60±10)%, 12h光暗循环; 自由摄食和饮水。

1.2 主要试剂和仪器

脱氢表雄酮 (dehydroepiandrosterone, DHEA) 购自上海源叶生物科技有限公司。兔源一抗促卵泡激素受体 (follicle-stimulating hormone receptor, FSHR; PA5-50963)、Atg5 (MA5-32289)、p62 (PA5-20839)、Beclin-1 (PA1-16857)、LC3A/LC3B (PA1-16931)、Alexa Fluor® 647标记的山羊抗兔IgG二抗 (A-21244) 购自美国ThermoFisher Scientific公司。Ts2-FC倒置荧光显微镜 (日本Nikon公司), FACScan流式细胞仪 (美国BD Biosciences公司), Mx3005P实时荧光定量PCR (real-time fluorescent quantitative, qRT-PCR) 仪 (美国Stratagene公司), LSM 900激光扫描共聚焦显微镜 (德国ZEISS公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 PCOS模型的建立 将大鼠随机分为正常组和PCOS组, 每组15只。PCOS组大鼠参照文献^[12]方法造模: 连续21 d皮下注射DHEA (6 mg/100 g, 溶于0.2 mL豆油)。从第16日开始进行阴道涂片检查, 观察阴道涂片, 记录大鼠的发情周期, 连续出现角质细胞 (动情周期紊乱), 并经卵巢病理切片检测显示卵巢有多囊改变^[13], 提示造模成功。正常组大鼠正常饲养。注射DHEA第21日, 将大鼠禁食12 h后称重, 摘取卵巢组织备用; 并分离卵巢GC^[14]。

1.3.2 卵巢GC的分离与培养 取出正常组和PCOS组大鼠卵巢并置于无血清高糖DMEM培养基中, 去除脂肪和结缔组织。将卵巢洗涤并悬浮在DMEM/F12培养基中, 然后在显微镜下用细针穿刺卵泡, 将GC释放到培养基中。然后, 轻吹数次以分散细胞, 再通过200目尼龙网过滤纯化。将收集的GC离心 (200×g, 5 min), 弃去上清液, 将细胞重新悬浮在新鲜的DMEM培养基中, 在37℃、5% CO₂细胞培养箱中培养。在倒置荧光显微镜下观察细胞形态。

1.3.3 FSHR免疫荧光染色鉴定大鼠卵巢GC 将细胞爬片切成适当大小, 在浓硫酸中浸泡一夜, 然后用自来水冲洗5次, 灭菌备用。将细胞爬片置于无菌条件下的24孔培养板中, 加入细胞悬液进行培养。待细胞长至70%汇合时取出爬片, 4%多聚甲醛固定20 min, PBS洗3次, 加入0.3% H₂O₂, 并在室温下孵育30 min以去除内源性过氧化物。然后, 加入0.2% Triton X-100孵育5 min。接下来, 用10%山羊血清封闭30 min后, 将细胞与FSHR一抗 (1:200) 在4℃下孵育过夜。用PBS洗涤3次后, 将Alexa Fluor® 647

标记的二抗IgG (1:200) 加入细胞爬片中, 室温避光孵育1 h。DAPI染核, 二甲苯透明, 封片; 光学显微镜下观察FSHR阳性表达细胞并计数, 以证明成功分离卵巢GC。

1.3.4 细胞转染 将卵巢GC以每孔2×10⁵个细胞的密度接种于6孔板中, 分组为: 空白组 (正常组大鼠卵巢GC), PCOS大鼠卵巢GC分为对照组、miR-NC组 (转染miR-30b-5p mimic的阴性对照miR-NC)、miR-30b-5p过表达组 (转染miR-30b-5p mimic)、miR-30b-5p过表达+pcDNA3.1-NC组 (miR-30b-5p mimic和pcDNA3.1-Atg5阴性对照空载体质粒共转染)、miR-30b-5p过表达+pcDNA3.1-Atg5组 (miR-30b-5p mimic和pcDNA3.1-Atg5质粒共转染), 待细胞生长密度达90%以上时, 使用Lipofectamine 3000试剂进行转染。每组设置6个重复。收集转染48 h的细胞, qRT-PCR检测各组细胞中miR-30b-5p和Atg5 mRNA表达, 检测方法见“1.3.5”; 并采用Western blotting检测Atg5的蛋白表达, 检测方法见“1.3.9”。

1.3.5 qRT-PCR检测卵巢组织/细胞中miR-30b-5p和Atg5 mRNA表达 为明确miR-30b-5p和Atg5 mRNA在卵巢组织和细胞中的表达水平, 使用Trizol试剂从卵巢组织和培养细胞中提取总RNA, 并将RNA反转录为cDNA。使用miScript SYBR Green PCR Kit扩增miRNA; 使用SYBR Premix ExTaq扩增mRNA。条件如下: 95℃初始变性3 min, 然后95℃ 5 s、60℃ 20 s、72℃ 15 s, 40个循环。U6、β-actin作为参考基因以标准化目的基因的表达 (表1); 采用2^{-ΔΔC_t}方法进行定量。另采用Western blotting检测Atg5蛋白表达, 检测方法见“1.3.9”。

表1 用于qRT-PCR的引物序列

Tab 1 Primer sequences used for qRT-PCR

| Gene | Forward primer (5'→3') | Reverse primer (5'→3') | Length/bp |
|------------|--------------------------------|-----------------------------|-----------|
| miR-30b-5p | GCG CTG TAA ACA TCC TAC AC | GTG CAG GGT CCG AGG T | 245 |
| Atg5 | TGA CCA GTT TTG GAC CAT CA | AGG GTA TGC AGC TGT CCA TC | 158 |
| β-actin | CTA AGG CCA ACC GTG AAA AG | ACC AGA GGC ATA CAG GGA CA | 143 |
| U6 | CTC GCT TCG GCA GCA CAT ATA CT | ACG CTT CAG AAT TTG CGT GTC | 129 |

1.3.6 CCK-8法检测细胞活力 采用CCK-8法检测miR-30b-5p对GC增殖的影响。将GC以每孔4 000个细胞的密度接种到96孔板中, 并孵育直至细胞贴壁, 然后, 这些接种的细胞分别在转染后培养24、48和72 h, 每孔加入10 μL CCK-8溶液, 继续培养2 h。使用酶标仪在450 nm波长下检测各孔的光密度

[D (450 nm)] 值。每组设置6个重复。

1.3.7 流式细胞术检测细胞凋亡 使用膜联蛋白V (Annexin V)-异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) /碘化丙啶 (propidium iodid, PI) 凋亡试剂盒检测miR-30b-5p对GC细胞凋亡的影响。将细胞 (1×10⁵个/mL) 收集在不同的管中, 用

荧光染料 Annexin V-FITC 和 PI 各 5 μ L 在 25 $^{\circ}$ C 避光染色 20 min。随后,将染色的细胞用冷的 PBS 洗涤并悬浮,在 1 h 内对细胞进行流式细胞术分析。每组设置 6 个重复。

1.3.8 免疫荧光 LC3 染色 免疫荧光法检测 miR-30b-5p 对 GC 自噬的影响。将细胞接种到带有无菌盖玻片的 24 孔培养板中,在 4 $^{\circ}$ C 下用 4% 多聚甲醛固定 20 min,然后用 0.1% Triton X-100 透化并在室温下用 3% 牛血清白蛋白封闭 20 min。用 PBS 洗涤 3 次后,将细胞与 LC3 一抗 (1:100) 在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜,然后与荧光二抗 (1:200) 在室温下避光孵育 1 h。随后将细胞用 DAPI 避光染色 3 min 以观察细胞核。密封后在激光扫描共聚焦显微镜下观察。每组设置 6 个重复。

1.3.9 Western blotting 检测自噬相关蛋白 Atg5、p62、Beclin-1 和 LC3 的表达 Western blotting 检测 miR-30b-5p 对 GC 中自噬相关蛋白 (Atg5、p62、Beclin-1 和 LC3) 表达的影响。收集各组细胞,并取出卵巢组织 (仅用于检测 Atg5 蛋白表达),加入含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液提取细胞和卵巢组织中的总蛋白。在 12 000 \times g、4 $^{\circ}$ C 下离心 10 min 后,收集上清液,使用 BCA 法测量蛋白质浓度。然后将蛋白样品与 5 \times 上样缓冲液混合并在沸水中加热 10 min 以使蛋白质变性。样品在 SDS-PAGE 凝胶中分离,然后转移到 PVDF 膜

上。膜用 5% 脱脂牛奶封闭,然后在相应的抗体溶液 (Atg5、p62、Beclin-1、LC3、 β -actin, 均以 1:1 000 稀释) 中孵育过夜。洗涤后,将膜与二抗 (1:4 000) 在室温下孵育 1 h。增强化学发光法 (enhanced chemiluminescence, ECL) 显色,用 Image-Pro Plus 6.0 分析蛋白质条带灰度,并以 β -actin 为内参蛋白,计算目的蛋白的相对表达水平。

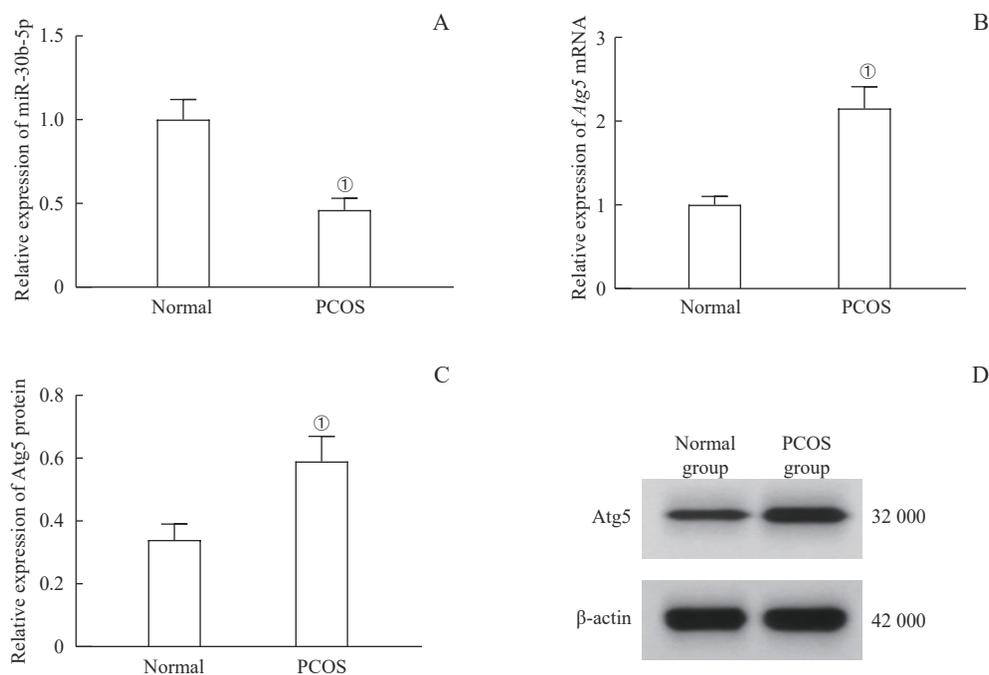
1.4 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。2 组数据比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-30b-5p 在 PCOS 大鼠卵巢组织中呈低表达, Atg5 表达升高

qRT-PCR 和 Western blotting 检测卵巢组织中 miR-30b-5p 及 Atg5 mRNA 和蛋白表达水平,结果 (图 1) 显示,miR-30b-5p 在 PCOS 组中的表达显著低于正常组 ($P=0.000$),而 Atg5 的 mRNA 和蛋白水平显著高于正常组 (均 $P=0.000$)。



Note: A. Expression of miR-30b-5p. B. Expression of Atg5 mRNA. C. Expression of Atg5 protein. D. Detection of Atg5 protein in ovarian tissue by Western blotting. ① $P=0.000$, compared with the normal group.

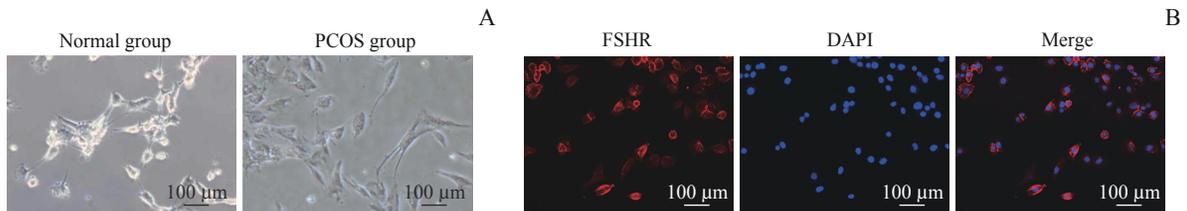
图 1 miR-30b-5p 和 Atg5 在 PCOS 大鼠卵巢组织中的表达

Fig 1 Expression of miR-30b-5p and Atg5 in ovarian tissue of PCOS rats

2.2 卵巢GC的鉴定

分别从正常组和PCOS组大鼠卵巢中分离出正常和PCOS模型GC,可见正常组GC呈多边形或梭形,细胞间由伪足连接在一起;PCOS组细胞呈多形性或纤维状,与正常组卵巢GC相比,PCOS组卵巢GC核大而圆,细胞数量增多,细胞一起生长(图2A)。

FSHR位于卵巢GC的细胞膜上,免疫荧光检测结果(图2B)显示,FSHR在细胞膜上呈红色,在细胞核内不呈红色,FSHR蛋白在大鼠卵巢GC的平均阳性表达量94.05%(>90%)。证明分离的原代大鼠卵巢GC纯度高,可用于后续实验。



Note: A. Morphology of ovarian GC. B. Identification of ovarian GC. Red fluorescence represents FSHR positive; blue fluorescence represents DAPI-stained nuclei; FSHR can be seen expressed on the cell membrane.

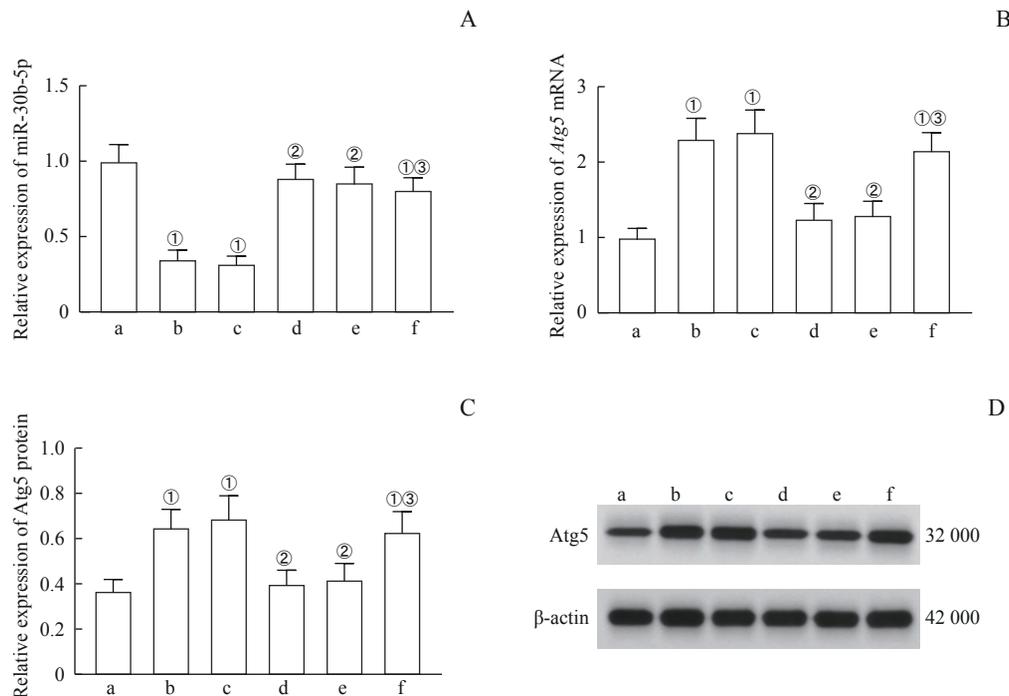
图2 原代大鼠卵巢GC的鉴定(×200)

Fig 2 Identification of primary rat ovarian GC (×200)

2.3 过表达miR-30b-5p降低大鼠卵巢GC中Atg5的表达水平

如图3所示,与空白组相比,对照组卵巢GC中miR-30b-5p水平显著降低,Atg5 mRNA和蛋白水平显著升高(均 $P=0.000$);与对照组相比,miR-30b-5p

过表达组卵巢GC中miR-30b-5p水平显著升高,Atg5 mRNA和蛋白水平显著降低(均 $P=0.000$);与miR-30b-5p过表达组相比,miR-30b-5p过表达+pcDNA3.1-Atg5组卵巢GC中Atg5 mRNA和蛋白水平显著升高(均 $P=0.000$)。



Note: A. Relative expression of miR-30b-5p. B. Relative expression of *Atg5* mRNA. C. Relative expression of Atg5 protein. D. Western blotting to detect the expression of Atg5 protein in ovarian GC of rats in each group. a—blank group; b—control group; c—miR-NC group; d—miR-30b-5p overexpression group; e—miR-30b-5p overexpression+pcDNA3.1-NC group; f—miR-30b-5p overexpression+pcDNA3.1-Atg5 group. ① $P=0.000$, compared with the blank group; ② $P=0.000$, compared with the control group; ③ $P=0.000$, compared with the miR-30b-5p overexpression group.

图3 各组大鼠卵巢GC中miR-30b-5p和Atg5水平比较

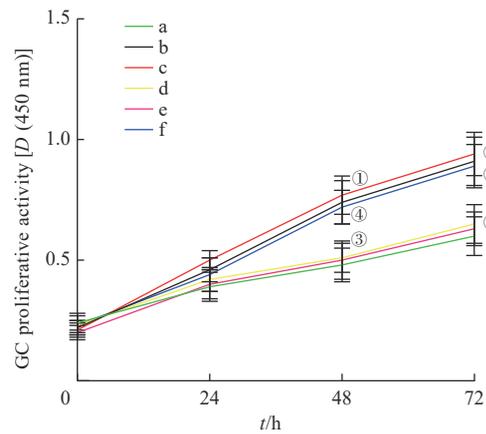
Fig 3 Comparison of miR-30b-5p and Atg5 levels in ovarian GC of rats in each group

2.4 过表达 miR-30b-5p 降低大鼠卵巢 GC 增殖活性

如图4所示, 转染48、72 h时, 与空白组相比, 对照组卵巢GC增殖活性显著升高 ($P=0.012$, $P=0.008$); 与对照组相比, miR-30b-5p过表达组卵巢GC增殖活性显著降低 ($P=0.027$, $P=0.027$); 与miR-30b-5p过表达组相比, miR-30b-5p过表达+pcDNA3.1-Atg5组卵巢GC增殖活性显著升高 ($P=0.047$, $P=0.044$)。

2.5 过表达 miR-30b-5p 抑制大鼠卵巢 GC 凋亡

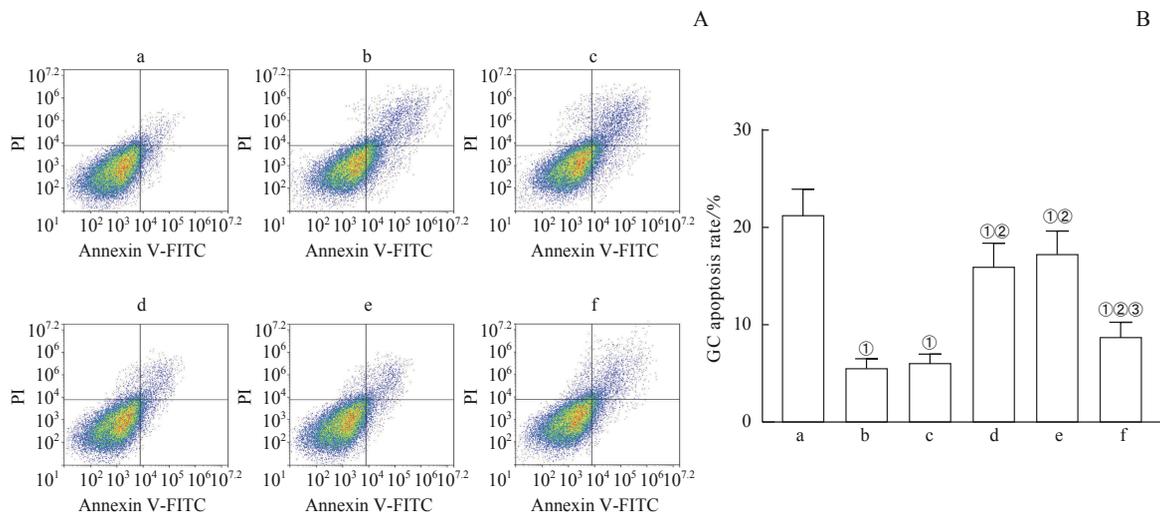
如图5所示, 与空白组相比, 对照组卵巢GC凋亡率显著降低 ($P=0.000$); 与对照组相比, miR-30b-5p过表达组卵巢GC凋亡率显著升高 ($P=0.000$); 与miR-30b-5p过表达组相比, miR-30b-5p过表达+pcDNA3.1-Atg5组卵巢GC凋亡率显著降低 ($P=0.000$)。



Note: a—blank group; b—control group; c—miR-NC group; d—miR-30b-5p overexpression group; e—miR-30b-5p overexpression+pcDNA3.1-NC group; f—miR-30b-5p overexpression+pcDNA3.1-Atg5 group. ^① $P=0.012$, ^② $P=0.008$, compared with the blank group; ^③ $P=0.027$, compared with the control group; ^④ $P=0.047$, ^⑤ $P=0.044$, compared with the miR-30b-5p overexpression group.

图4 各组大鼠卵巢GC增殖活性

Fig 4 Proliferative activity of rat ovarian GC in each group



Note: A. Detection of apoptosis by flow cytometry. B. GC apoptosis rate in each group. a—blank group; b—control group; c—miR-NC group; d—miR-30b-5p overexpression group; e—miR-30b-5p overexpression+pcDNA3.1-NC group; f—miR-30b-5p overexpression+pcDNA3.1-Atg5 group. ^① $P=0.000$, compared with the blank group; ^② $P=0.000$, compared with the control group; ^③ $P=0.000$, compared with the miR-30b-5p overexpression group.

图5 各组大鼠卵巢GC凋亡水平

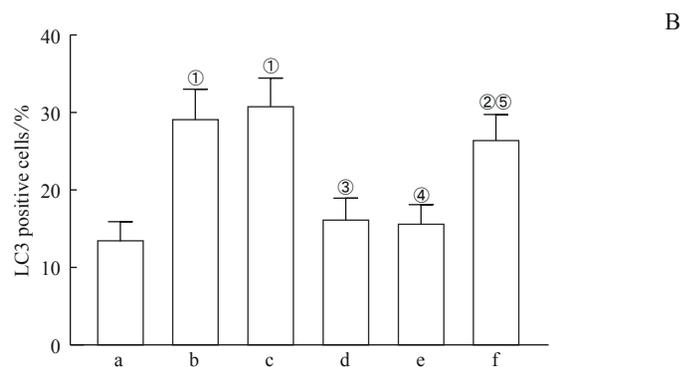
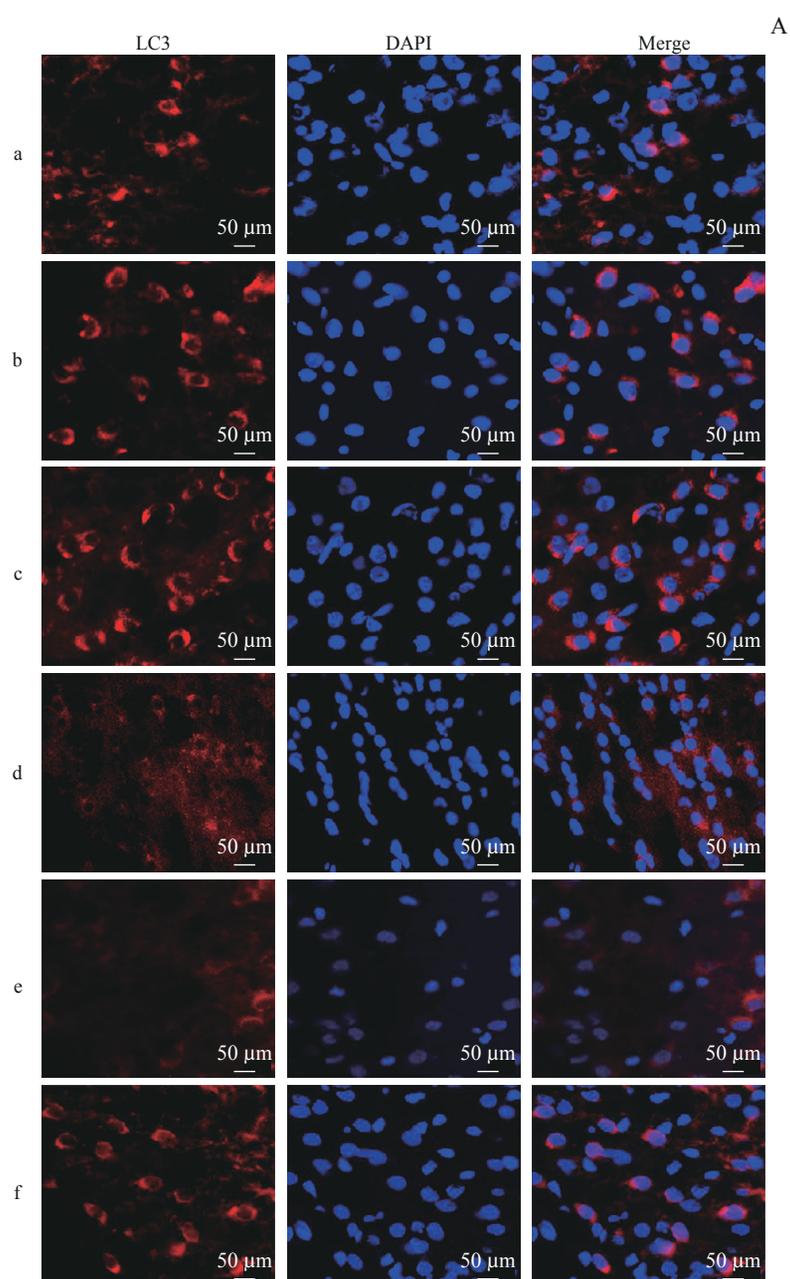
Fig 5 Apoptosis levels of ovarian GC in rats in each group

2.6 过表达 miR-30b-5p 降低大鼠卵巢 GC 中 LC3 阳性表达

如图6所示, 与空白组相比, 对照组卵巢GC中LC3阳性细胞百分比显著升高 ($P=0.000$); 与对照组相比, miR-30b-5p过表达组卵巢GC中LC3阳性细胞百分比显著降低 ($P=0.002$); 与miR-30b-5p过表达组相比, miR-30b-5p过表达+pcDNA3.1-Atg5组卵巢GC中LC3阳性细胞百分比显著升高 ($P=0.010$)。

2.7 过表达 miR-30b-5p 提高大鼠卵巢 GC 中 p62 蛋白表达, 降低 Beclin-1 和 LC3 蛋白表达

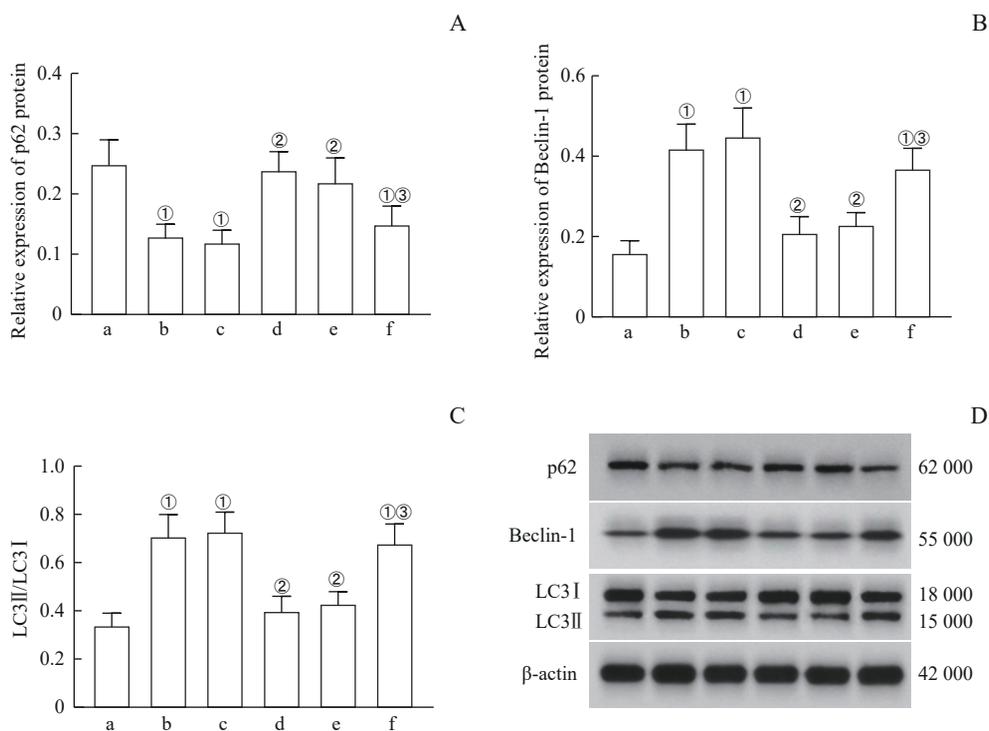
如图7所示, 与空白组相比, 对照组卵巢GC中Beclin-1蛋白水平和LC3II/LC3I比值显著升高, p62蛋白水平显著降低 (均 $P=0.000$); 与对照组相比, miR-30b-5p过表达组卵巢GC中Beclin-1蛋白水平和LC3II/LC3I比值显著降低, p62蛋白水平显著升高 (均 $P=0.000$); 与miR-30b-5p过表达组相比, miR-30b-5p过表达+pcDNA3.1-Atg5组Beclin-1蛋白水平和LC3II/LC3I比值显著升高, p62蛋白水平显著降低 (均 $P=0.000$)。



Note: A. Immunofluorescence LC3 staining ($\times 400$). B. LC3 positive cells in each group. a—blank group; b—control group; c—miR-NC group; d—miR-30b-5p overexpression group; e—miR-30b-5p overexpression+pcDNA3.1-NC group; f—miR-30b-5p overexpression+pcDNA3.1-Atg5 group. ^① $P=0.000$, ^② $P=0.002$, compared with the blank group; ^③ $P=0.002$, ^④ $P=0.001$, compared with the control group; ^⑤ $P=0.010$, compared with the miR-30b-5p overexpression group.

图6 各组大鼠卵巢GC中LC3阳性表达

Fig 6 Positive expression of LC3 in rat ovarian GC in each group



Note: A. Relative expression of p62 protein. B. Relative expression of Beclin-1 protein. C. Relative expression of LC3II/LC3I. D. Western blotting to detect protein expression in ovarian GC of rats in each group. a—blank group; b—control group; c—miR-NC group; d—miR-30b-5p overexpression group; e—miR-30b-5p overexpression+pcDNA3.1-NC group; f—miR-30b-5p overexpression+pcDNA3.1-Atg5 group. ^① $P=0.000$, compared with the blank group; ^② $P=0.000$, compared with the control group; ^③ $P=0.000$, compared with the miR-30b-5p overexpression group.

图7 各组大鼠卵巢GC中p62、Beclin-1和LC3蛋白表达

Fig 7 Expression of p62, Beclin-1 and LC3 proteins in ovarian GC of rats in each group

3 讨论

近年来, miRNA被认为是基因表达的重要调节因子,与多种疾病密切相关,可作为疾病诊断和预后的优良指标。本研究选择了miR-30b-5p作为研究起点,并确定了其在PCOS大鼠模型中的差异表达水平;进一步的体外功能实验表明,miR-30b-5p过表达可通过抑制自噬来抑制GC增殖,并促进细胞凋亡;这些变化可能会抑制PCOS的发展。在生物信息学工具的帮助下,上述功能的潜在承载者被预测并确认为Atg5^[11]。本研究首次证实了miR-30b-5p对PCOS的影响。

miR-30b-5p是一种miRNA,在多种疾病的治疗中发挥作用,可调节自噬。例如,GUO等^[9]研究显示,在小鼠肝脏中过表达miR-30b-5p可通过与细胞核中的CLEAR元件结合抑制转录因子EB(TFEB)下游基因的转录,进一步抑制溶酶体生物发生和自噬通量。LIU等^[11]发现miR-30b-5p的抑制与肝细胞癌中自噬启动子相关;而升高miR-30b-5p表达可通过抑制自噬,增强前列腺癌的放射敏感性^[15]。本研究结果显示,miR-30b-5p在PCOS模型大鼠卵巢组织及其GC中呈低表达,这

提示miR-30b-5p的异常表达可能参与PCOS的发生发展。为了验证此推论,本研究通过将过表达miR-30b-5p的质粒转染到PCOS大鼠卵巢GC中以上调miR-30b-5p。结果显示,上调miR-30b-5p表达后卵巢GC的增殖和自噬明显受到抑制,且凋亡增加;与以往的研究^[9, 11, 15]结果一致。这提示miR-30b-5p过表达可抑制自噬,miR-30b-5p可能是PCOS的潜在治疗靶点。

已有研究证实Atg5在PCOS患者卵泡中表达明显升高,且主要在卵泡GC中表达;降低Beclin-1、Atg5和LC3II水平,抑制GC自噬,可促进卵泡发育,减轻PCOS大鼠的排卵障碍^[16]。生物信息学预测显示Atg5是miR-30b-5p的靶基因;SUN等^[10]研究也证实,敲低miR-30b-5p可促进Atg5和Beclin-1表达,激活自噬。在本研究中,我们发现PCOS大鼠卵巢组织和GC中miR-30b-5p表达降低的同时伴随着Atg5 mRNA和蛋白水平的升高,而上调miR-30b-5p后,Atg5及其他自噬相关蛋白Beclin-1和LC3II/LC3I比值均降低,p62表达升高;说明miR-30b-5p的过表达可抑制自噬。为了验证miR-30b-5p对自噬的调节机制,本研究在过表达miR-30b-5p的基础上,采用质粒转染上调Atg5表达;

结果显示, Atg5的上调可明显减弱 miR-30b-5p 过表达对卵巢GC增殖和自噬的抑制作用。这提示 miR-30b-5p 可能通过抑制 Atg5 表达影响 PCOS 的发生发展。

综上所述, miR-30b-5p 在 PCOS 中呈低表达, 上调 PCOS 大鼠卵巢 GC 中 miR-30b-5p 表达可抑制 PCOS 大鼠卵巢 GC 增殖和自噬, 并促进凋亡, 其作用机制可能与抑制 Atg5 表达有关。本研究为 miR-30b-5p 在 PCOS 中的作用研究奠定了一定基础, 有助于加深对 PCOS 发病机制的理解, 同时为 PCOS 的治疗提供新思路。未观察 miR-30b-5p 对 PCOS 大鼠卵巢 GC 细胞形态结构变化和生化特征的影响是本研究存在的不足, 在后续的研究中会进行补充; 此外, 在未来的研究中将结合体内动物实验以进一步确定 miR-30b-5p 在 PCOS 发展过程中对卵巢功能的影响。

利益冲突声明/Conflict of Interests

所有作者声明不存在利益冲突。

All authors disclose no relevant conflict of interests.

伦理批准和动物权利声明/Ethics Approval and Animal Right

本研究涉及的所有动物实验均已通过商丘市第一人民医院动物管理和使用委员会的审核批准(文件号 2020004)。所有实验过程均遵照《河南省实验动物管理办法》的条例进行。

All experimental animal protocols in this study were reviewed and approved by the Laboratory Animal Management and Use Committee of Shangqiu First People's Hospital (No. 2020004), and all experimental animal protocols were carried out by following the guidelines of Henan Province on the Administration of Experimental Animals.

作者贡献/Authors' Contributions

王雪敏和牛爱琴参与实验设计;王雪敏、王亚楠、叶英完成实验操作;王雪敏、王亚楠、叶英、李飞参与论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意最终稿件的提交。

The study was designed by WANG Xuemin and NIU Aiqin. The experimental operation was completed by WANG Xuemin, WANG Yanan and YE Ying. The manuscript was drafted and revised by WANG Xuemin, WANG Yanan, YE Ying and LI Fei. All the authors have read the last version of paper and consented for submission.

- Received: 2022-06-15
- Accepted: 2022-11-03
- Published online: 2023-01-16

参·考·文·献

- [1] BJEKIĆ -MACUT J, VUKAŠIN T, VELIJA-AŠIMI Z, et al. Polycystic ovary syndrome: a contemporary clinical approach[J]. *Curr Pharm Des*, 2021, 27(36): 3812-3820.
- [2] ASADUZZAMAN M, RODGERS R J, YOUNG F M. Quantification of viable granulosa cells in murine ovarian follicles[J]. *Biotech Histochem*, 2020, 95(7): 540-554.
- [3] LI X X, QI J, ZHU Q L, et al. The role of androgen in autophagy of granulosa cells from PCOS[J]. *Gynecol Endocrinol*, 2019, 35(8): 669-672.
- [4] YEFIMOVA M G, LEFEVRE C, BASHAMBOO A, et al. Granulosa cells provide elimination of apoptotic oocytes through unconventional autophagy-assisted phagocytosis[J]. *Hum Reprod*, 2020, 35(6): 1346-1362.
- [5] LUO X D, GONG Y Y, CAI L Y, et al. Chemerin regulates autophagy to participate in polycystic ovary syndrome[J]. *J Int Med Res*, 2021, 49(11): 3000605211058376.
- [6] XU X Y, SONG X L, XU X H, et al. Inhibition of sestrin 1 alleviates polycystic ovary syndrome by decreasing autophagy[J]. *Aging*, 2021, 13(8): 11774-11785.
- [7] 杨潇曼, 王克华, 王晓丹, 等. MiRNA-2861、miRNA-483-3p 与多囊卵巢综合征患者内分泌代谢及卵母细胞质量的相关性[J]. *现代妇产科进展*, 2021, 30(9): 666-669.
YANG X M, WANG K H, WANG X D, et al. Correlation of miRNA-2861, miRNA-483-3p with endocrine metabolism and oocyte quality in patients with polycystic ovary syndrome[J]. *Progress in Obstetrics and Gynecology*, 2021, 30(9):666-669.
- [8] CHEN Q, LI Z, XU Z, et al. MiR-378d is involved in the regulation of apoptosis and autophagy of and E2 secretion from cultured ovarian granulosa cells treated by sodium fluoride[J]. *Biol Trace Elem Res*, 2021, 199(11): 4119-4128.
- [9] GUO H J, PU M, TAI Y S, et al. Nuclear miR-30b-5p suppresses TFEB-mediated lysosomal biogenesis and autophagy[J]. *Cell Death Differ*, 2021, 28(1): 320-336.
- [10] SUN B, OU H, REN F, et al. Propofol protects against cerebral ischemia/reperfusion injury by down-regulating long noncoding RNA SNHG14[J]. *ACS Chem Neurosci*, 2021, 12(16): 3002-3014.
- [11] LIU Z Q, WEI X Q, ZHANG A Q, et al. Long non-coding RNA HNF1A-AS1 functioned as an oncogene and autophagy promoter in hepatocellular carcinoma through sponging hsa-miR-30b-5p[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 473(4): 1268-1275.
- [12] 邵梅, 王家传. 淫羊藿素对多囊卵巢综合征颗粒细胞凋亡和自噬的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2021, 37(20): 2830-2833.
SHAO M, WANG J C. Effect of icariin on apoptosis and autophagy of granulosa cells in polycystic ovary syndrome[J]. *The Chinese Journal of Clinical Pharmacology*, 2021, 37(20): 2830-2833.
- [13] YE H, LIU X J, HUI Y, et al. Downregulation of microRNA-222 reduces insulin resistance in rats with PCOS by inhibiting activation of the MAPK/ERK pathway via pten[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 22: 733-741.
- [14] SHEN H R, WANG Y. Activation of TGF-β1/Smad3 signaling pathway inhibits the development of ovarian follicle in polycystic ovary syndrome by promoting apoptosis of granulosa cells[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(7): 11976-11985.
- [15] CAI F Z, LI J W, ZHANG J Y, et al. Knockdown of Circ_CCNB2 sensitizes prostate cancer to radiation through repressing autophagy by the miR-30b-5p/KIF18A axis[J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2022, 37(6): 480-493.
- [16] LIU M, ZHU H Q, ZHU Y, et al. Guizhi Fuling Wan reduces autophagy of granulosa cell in rats with polycystic ovary syndrome via restoring the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 270: 113821.

[本文编辑] 邵碧云