

卵泡液细胞外囊泡携带的 microRNA 对卵泡闭锁影响的研究进展

王莹, 王晓梅, 赵蕴琦, 吴盛辉, 张涌, 权富生

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

王莹, 王晓梅, 赵蕴琦, 吴盛辉, 张涌, 权富生. 卵泡液细胞外囊泡携带的 microRNA 对卵泡闭锁影响的研究进展. 生物工程学报, 2022, 38(8): 2767-2783.

WANG Y, WANG XM, ZHAO YQ, WU SH, ZHANG Y, QUAN FS. Progress in the effect of microRNA carried by extracellular vesicles in follicular fluid on follicular atresia. Chin J Biotech, 2022, 38(8): 2767-2783.

摘要: 细胞外囊泡 (extracellular vesicles, EVs) 是细胞主动释放的膜结合颗粒。在原核生物和真核生物中, EVs 被认为是细胞间进行信息交流的一种方式。EVs 具有携带蛋白质、脂质和核酸等生物大分子的能力, 可以影响亲本细胞和受体细胞的不同生理功能。其中, EVs 携带的 microRNA 研究报道最多, 在生物体生理功能方面发挥着重要作用。卵泡在发育过程中, 只有少数卵泡可以充分发育、成熟、排卵, 大多数卵泡在发育的不同阶段发生闭锁。在卵泡发育的整个过程中, 每一阶段的变化以及卵泡闭锁调控机制还不完全清楚。本文在总结 EVs 类型、特性、分离方法及用途的基础上, 从不同细胞因子、激素方面重点论述了卵泡液中 EVs 携带的 microRNA 是如何调控卵泡闭锁, 同时对卵泡液 EVs 携带的 microRNA 在生殖调控和生殖疾病诊断方面的研究前景进行了展望, 对于卵泡发育调控研究以及有效利用研究具有一定参考意义。

关键词: 卵泡液; 细胞外囊泡; microRNA; 卵泡闭锁

Received: December 7, 2021; **Accepted:** March 25, 2022

Supported by: National Science and Technology Major Projects (2016ZX08007002, 2016ZX08007003)

Corresponding authors: ZHANG Yong. E-mail: zhangyong1956@nwsuaf.edu.cn
QUAN Fusheng. E-mail: quanfusheng@nwsuaf.edu.cn

基金项目: 国家科技重大专项 (2016ZX08007002, 2016ZX08007003)

Progress in the effect of microRNA carried by extracellular vesicles in follicular fluid on follicular atresia

WANG Ying, WANG Xiaomei, ZHAO Yunqi, WU Shenghui, ZHANG Yong, QUAN Fusheng

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) are membrane-bound particles actively released by cells. In prokaryotes and eukaryotes, EVs are effective bridges for communication between cells. EVs carry biological macromolecules, including proteins, lipids and nucleic acid, which affects different physiological functions of parent cells and recipient cells. Among them, the microRNA carried by EVs is the most reported and plays an important role in physiological function of organisms. During the development of follicles, only a few follicles can fully develop and ovulate, whereas most of them undergo atresia at different stages of development. In the whole process of follicular development, the changes at each stage and the regulation mechanism of follicular atresia are not completely understood. In this paper, we introduced the types, characteristics, isolation methods and uses of EVs, and emphasized how microRNA carried by EVs in follicular fluid regulated follicular atresia from the aspects of different cytokines and hormones. Additionally, the application prospect of microRNA carried by EVs in follicular fluid in reproductive regulation and reproductive disease diagnosis was discussed. This paper is significant for studying the regulation of follicular development and the effective utilization of oocytes.

Keywords: follicular fluid; extracellular vesicles; microRNA; follicular atresia

卵泡发育进程中, 卵泡闭锁是一种重要的生理现象。哺乳动物性成熟期后, 在每个性周期都会有大量卵泡发育, 一般情况下, 单胎动物只有 1-2 个优势卵泡能够发展至成熟卵泡并排卵, 大部分卵泡会在不同的发育阶段通过细胞凋亡而发生闭锁。卵泡闭锁的发生受多种因素调节, 已有的研究表明, 颗粒细胞 (granulosa cells, GCs)、卵母细胞 (oocytes) 以及卵泡内膜细胞 (theca cells, TCs) 凋亡均可导致卵泡闭锁的发生, 其中, 颗粒细胞凋亡起主要作用^[1-3]。

卵泡液中含有各种营养物质、微量元素、代谢废物、激素、生长因子以及细胞外囊泡等成分, 不同的卵泡液成分对颗粒细胞、卵母细

胞以及卵泡内膜细胞代谢、增殖和凋亡等生理过程有不同的影响。这些成分包含有近年来研究的热点问题——细胞外囊泡 (extracellular vesicles, EVs), EVs 携带大量 microRNA, 这些 microRNA 在卵泡发育过程中发挥怎样的作用和如何发挥作用, 是该领域研究的关键问题, 结合本实验室卵泡液 EVs 的研究, 本文现就有关卵泡液中 EVs 携带的 microRNA 对卵泡闭锁的研究进行了总结。

1 卵泡液细胞外囊泡简介

1.1 细胞外囊泡类型及其分离

EVs 主要分为 3 种类型^[4-7]: 起源于内体途

径形成的外泌体 (exosomes); 从质膜上出芽形成的微泡 (microvesicles); 以及细胞在凋亡裂解时释放的凋亡小体 (apoptotic bodies) (图 1)。三种 EVs 的胞内来源不同^[8], 这也预示着不同类型的 EVs 可能执行不同的生物学功能。从细胞膜释放后, EVs 通过细胞表面膜蛋白发挥信息交换作用^[9], 并且在细胞之间发生物质交换、信号传导和信息传递等^[10-11]。EVs 被认为可以携带大量的生物学物质, 包括蛋白质、细胞因子^[7]、膜受体、受体配体、核酸 (如 DNA、mRNA、长短非编码 RNA)、脂质^[12]和聚糖等。现有的 EVs 分离纯化方法主要分为两大类: 传统的超速离心方法和新方法, 如微流体过滤法、免疫吸附法以及非接触法^[13]。

1.2 卵泡液细胞外囊泡的研究

在哺乳动物中, 几乎所有体液都含有 EVs, 包括卵泡液, 其与卵泡发育息息相关。先前的研究已经成功从牛^[14-16]、山羊^[17]、猪^[18-20]、人^[21-22]、猫^[23]、马^[24]等哺乳动物卵泡液中分离出 EVs。研究表明, 从不同大小的卵泡中分离出的 EVs 具有不同的特性和功能^[16]。在相同的时间内, 牛颗粒细胞对小卵泡 (3-5 mm) 来源 EVs 的摄取程度明显高于中等卵泡 (6-9 mm) 和大卵泡 (>9 mm) 的 EVs, 其中, 摄取时间为 24 h 的摄取效果明显优于 2 h。来源于小卵泡、中等卵泡和大卵泡中的 EVs 对牛颗粒细胞均具有促进细胞增殖的作用, 但是, 小卵泡的 EVs 作用效果最显著^[16]。来源于小卵泡和大卵泡的 EVs 可以

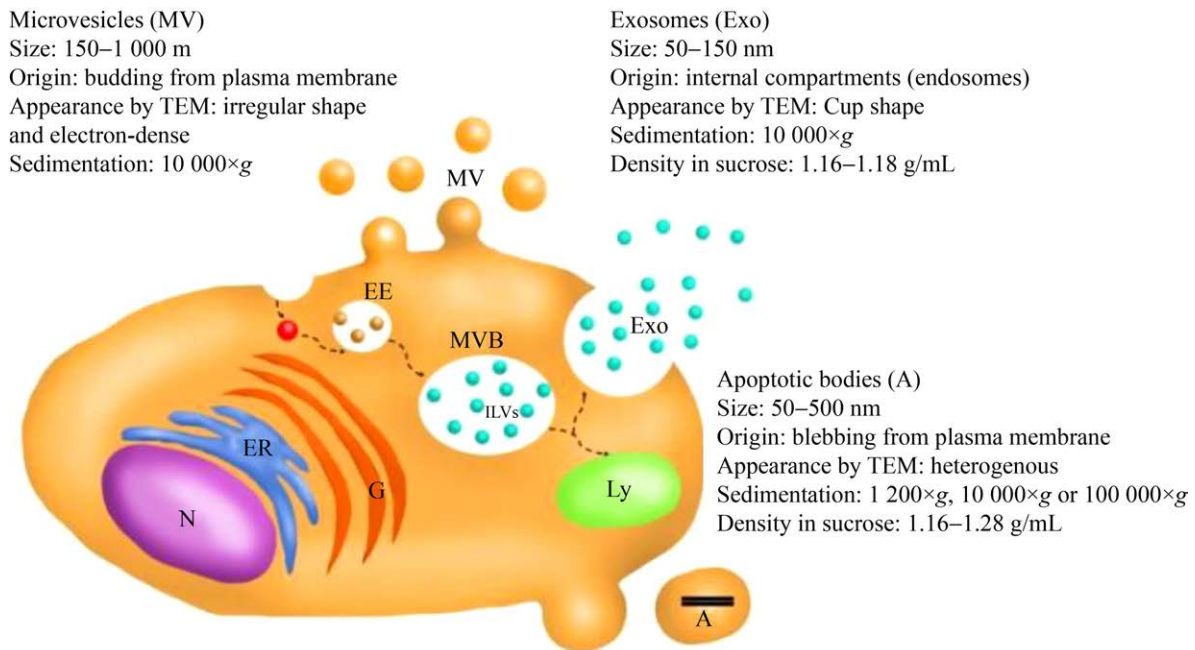


图 1 细胞外囊泡: 生物发生与释放^[7]

Figure 1 Extracellular vesicles (EVs): biogenesis and release^[7]. EVs are mainly classified in three subgroups: a) microvesicles/microparticles that bud from the plasma membrane; b) exosomes that are generated as ILVs by inward invagination of endosomes membranes giving rise to MVBs and then released into the extracellular space upon fusion of MVBs with the plasma membrane; c) apoptotic bodies that blebs from cells undergoing apoptosis. N: nucleus; ER: endoplasmic reticulum; G: Golgi complex; MVB: multi-vesicular body; ILV: intraluminal vesicle; Ly: lysosome; EE: early endosome.

促进卵丘扩张, 促进小鼠和牛卵丘细胞成熟及 *Ptgs2*、*Ptx3* 和 *Tnfrsf6* 等相关基因的表达, 其中, 小卵泡的 EVs 作用效果明显优于对照组和大卵泡组^[14]。卵泡液中的 EVs 促进了卵母细胞、颗粒细胞和卵泡中其他细胞类型之间的通讯, 其内容物 miRNA 作为调控卵母细胞的发育和卵巢成熟的重要成分之一, 在 EVs 介导的卵泡细胞通讯中扮演着重要角色^[22]。

2 卵泡液 EVs 中 microRNA 在卵泡闭锁中的作用

健康卵泡外观是清澈透明的, 具有完整的颗粒细胞层, 卵丘卵母细胞复合体清晰可见; 早期闭锁卵泡外观是浑浊的橙黄色, 颗粒细胞层部分破损, 卵丘卵母细胞复合体不易辨认; 晚期闭锁卵泡外观是浑浊的灰色, 颗粒细胞层和卵丘卵母细胞复合体严重脱落^[25]。正常生长的卵泡通过卵泡存活因子起到促生长和抗凋亡的作用; 通过凋亡因子调控卵泡颗粒细胞和膜细胞等凋亡, 导致卵泡退化闭锁。这些因子包括促黄体素 (LH) 和促卵泡素 (FSH)^[26-27]。如果缺少存活因子, 凋亡相关信号通路被激活, 发生卵泡闭锁, 此时, 颗粒细胞层减少, 卵母细胞核固缩、透明带膨胀塌陷, 卵泡膜细胞胞质内出现类脂质、黄素化, 构成所谓“间质腺”, 与基膜脱离后落入卵泡腔内, 卵泡液被吸收, 卵泡壁塌陷。然后卵母细胞退化, 颗粒细胞、卵泡膜细胞逐渐形成纤维体, 被卵泡间质吸收。与此同时, 颗粒细胞合成的雌激素减少, 孕酮增加, 促性腺激素受体数目减少^[25]。卵泡闭锁可以发生在卵泡生长和发育过程的任何阶段中, 但是在排卵阶段, 卵泡内细胞对凋亡信号不敏感, 所以没有发生卵泡闭锁现象。卵泡闭锁受不同内分泌因子、旁分泌因子、细胞类

型及其状态、信号通路、热应激信号、卵巢黄体的类型、激素、卵泡液以及微环境等调控。但是, 大部分卵泡闭锁与颗粒细胞凋亡有主要联系^[1-3]。

microRNA 是一类由内源基因编码的长度约为 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。每个 microRNA 可以有多个靶基因, 而几个 microRNA 也可以调节同一个基因。这种复杂的调节网络既可以通过一个 microRNA 来调控多个基因的表达, 也可以通过几个 microRNA 的组合来精细调控某个基因的表达。microRNA 存在多种形式, 最原始的是 pri-miRNA, 长度大约为 300–1 000 个碱基; pri-miRNA 经过一次加工后, 成为 pre-miRNA 即 microRNA 前体, 长度大约为 70–90 个碱基; pre-miRNA 再经过 Dicer 酶酶切后, 成为长约 20–24 nt 的成熟 microRNA。已经被鉴定的 microRNAs 据推测大都是由具有发夹结构, 约 70 个碱基大小形成发夹结构的单链 RNA 前体经过 Dicer 酶加工后生成的, 有 5'端磷酸基和 3'端羟基, 大小约 21–25 nt 的小分子 RNA 片段, 定位于 RNA 前体的 3'端或者 5'端。microRNA 在细胞分化、生物发育及疾病发生发展过程中发挥巨大作用。随着分子生物学的发展, 已经证实 microRNA 参与到多种生物学调控中, 包括细胞增殖凋亡、自噬、分化、胚胎发育、干细胞的更新、应激反应和代谢等^[28-33]。通过作用于翻译和转录后修饰, microRNA 在基因表达调控中发挥关键作用^[34]。卵泡内的 microRNA 参与了原始卵泡形成、卵泡募集和选择、卵泡闭锁、卵母细胞交流、颗粒细胞功能和黄体化等多种卵泡内的生物进程。在卵泡生长发育各阶段几乎都有可能出现卵泡闭锁现象, 卵母细胞的凋亡主要会导致初级卵泡的闭锁, 有时候也会伴随着卵泡细胞的

凋亡；而颗粒细胞凋亡最有可能导致次级卵泡和三级卵泡发生闭锁^[35]。目前研究最多的是颗粒细胞凋亡能导致卵泡闭锁，颗粒细胞凋亡也是导致卵泡闭锁现象最重要的原因。但是，细胞之间的相互作用对卵泡闭锁也有很重要的影响。同时，在卵泡液微环境中，颗粒细胞、卵母细胞以及卵泡内膜细胞这 3 种细胞研究最多、联系最密切。所以考虑从颗粒细胞、卵母细胞以及卵泡内膜细胞携带的 microRNA 着手，按照不同的细胞类型，同时结合从卵巢卵泡液分离得到的 EVs 中的 microRNA 表达谱，介绍这些 microRNA 与卵泡闭锁发生的必然联系。

EVs 是存在于生物流体中的膜结合囊泡，其携带和转移调节分子，例如 microRNA 和蛋白质，能介导细胞间通讯。卵泡液 EVs 对卵泡生长、卵母细胞发育和成熟均有重要作用^[22,36-53]。通过鉴定人类卵泡液 EVs 中 microRNA，发现它们在人类卵泡液中具有很高的代表性，并参与卵泡成熟。它们可能代表辅助生殖技术中卵母细胞质量的非侵入性生物标志物^[28]，并且在不同发情周期的卵泡中，EVs 中 microRNA 含量不同^[29]。总之，卵泡液 EVs 中 microRNA 参与卵泡发育，对卵泡生长具有重要意义。

来自于不同卵泡大小 EVs 中的 microRNA 对卵泡的作用会随卵泡尺寸的大小改变而变化，对细胞状态也有不同程度的影响。例如：小卵泡 EVs 中含量丰富的 microRNA 与细胞增殖通路相关，大卵泡 EVs 中含量丰富的 microRNA 与炎症反应通路相关^[30]。除此之外，卵泡闭锁期间 microRNA 表达量会发生明显变化^[31]。microRNA 在卵巢中的表达随细胞类型、功能和发情周期的不同而改变。已有研究证明，EVs 携带的 microRNA 在牛卵泡液中的存在，在卵泡液微环境中，卵

母细胞生长依赖于 EVs 携带的 microRNA 特征而变化^[32]。目前，已经有很多关于卵泡液 EVs 携带的 microRNA 的研究，从卵巢卵泡液中分离 EVs 的方法也较成熟。早前已经有研究者从卵巢卵泡液中分离得到 EVs，进而鉴定了 EVs 携带的 microRNA，通过对 EVs 进行标记，证明卵泡内细胞能够摄取 EVs，行使相应的功能^[33]。总之，卵泡液 EVs 中 microRNA 通过作用于卵泡内的细胞来调控卵泡闭锁。

3 卵泡液 EVs 中 microRNA 通过卵泡内细胞调控卵泡闭锁

根据文献报道，本文对卵泡液 EVs 中 microRNA 参与调控卵泡闭锁主要的细胞类型进行了总结，见图 2 和表 1。在卵泡中，颗粒细胞是数量最多的细胞类型，在卵泡生长、发育过程中起着至关重要的作用。颗粒细胞作为卵母细胞营养物质的供给者，调控卵母细胞发育和成熟。颗粒细胞凋亡是诱导卵泡闭锁的关键原因，同时还影响卵泡数量和质量^[3]。颗粒细胞凋亡过程受多种因素的调控，microRNA 为其中之一调控因素^[3]。在卵泡发育成熟过程中，颗粒细胞、卵母细胞和卵泡内膜细胞之间是互相作用并共同调控卵泡功能，发生卵泡闭锁。内膜是一种特殊的基质层，它包含毛细血管，卵泡膜细胞可合成雄激素，由临近的颗粒细胞将雄激素转化成雌二醇，为卵泡发育提供营养物质，介导卵母细胞与颗粒细胞之间的交互作用进而参与调控细胞凋亡和卵泡发育过程。

3.1 卵泡液 EVs 携带的 microRNA 通过颗粒细胞调控卵泡闭锁

关于卵泡液 EVs 携带的 microRNA 通过颗粒细胞调控卵泡闭锁的研究总结见表 2。目前已经有大量的研究表明，microRNA 可以调控颗粒细胞参与卵泡闭锁。其中，miR-181b 能通过

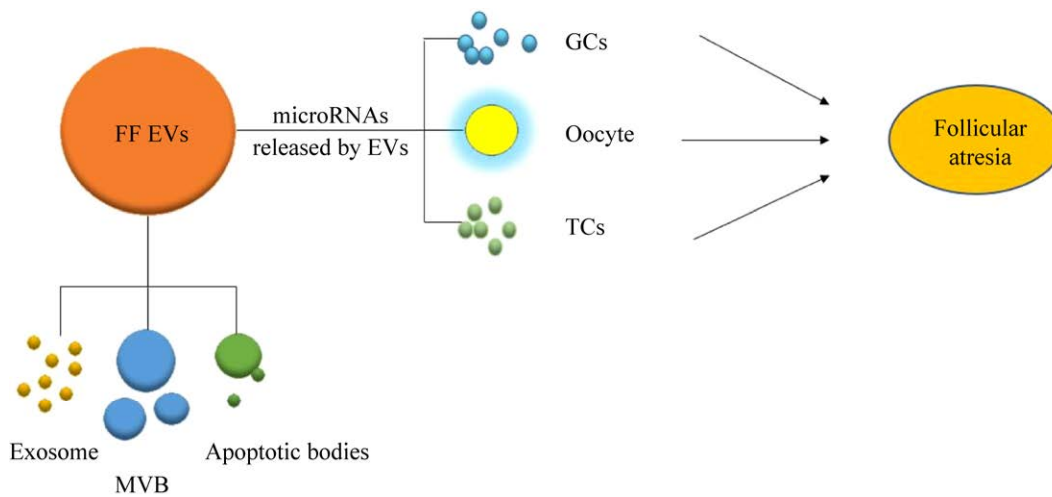


图 2 卵泡液细胞外囊泡中的 **microRNA** 对卵泡闭锁的调节

Figure 2 Regulation of follicular atresia by microRNAs in extracellular vesicles of follicular fluid. FF EVs: extracellular vesicles in follicular fluid; exosome: exosomes; MVB: multi-vesicular body; apoptotic bodies: apoptotic bodies; GCs: granulosa cells; oocyte: oocyte; TCs: theca cells.

表 1 卵泡内细胞通过卵泡液 EVs 中 **microRNA** 调控卵泡闭锁

Table 1 Cells in follicles regulate follicular atresia through microRNAs carried by extracellular vesicles in follicular fluid

Cell type affected	microRNA in follicular fluid EVs	References
GCs	miR-155-HIF1A; miR-199a-5p; miR-222; miR-150; miR-378-VEGFA; miR-372; miR-382; miR-29; miR-375; miR-146b; miR-181b; miR-10a-5p; miR-26b; miR-144-5p miR-146a; miR-10a; miR-644-5p	[24,31,34-50]
Oocytes	miR-204; miR-197; miR-146b; miR-30; miR-383; miR-2285; miR-451; miR-132; miR-486; miR-874; let-7c; miR-375; miR-24; miR-19a; miR-125b; miR-106b; miR-374a; miR-15b	[15,51]
TCs	miR-199a-5p; miR-150; miR-378; miR-155; miR-222	[24,31]

抑制 *SMAD7* 基因的表达来激活 TGF- β 通路来抑制颗粒细胞凋亡^[41]。卵泡闭锁均发生在排卵前的阶段，而在排卵前卵泡颗粒细胞中未检测到 miR-382，但是与排卵前相比，卵泡颗粒细胞中 miR-372 和 miR-382 水平升高^[40]。这说明 miR-372 和 miR-382 可能参与了卵泡闭锁。除

此之外，miR-375 和 miR-222 参与调控颗粒细胞凋亡^[44-45]。

内源性非编码 RNA 研究的出现，为探索卵泡闭锁的调控机制提供了新的视角。miR-26b 通过 HAS2-HA-CD44-caspase-3 途径直接靶向诱导颗粒细胞凋亡和卵泡闭锁^[38]。HAS2 表达的

降低是 miR-26b 促进 GC 凋亡的机制之一。而 miR-146b 是一种调控颗粒细胞功能、卵泡发育和雌性生殖的新型表观遗传因子。通过降低 *CYP19A1* 表达来上调 miR-146b, 从而促进猪卵巢颗粒细胞凋亡^[43]。miR-29 及其靶基因参与了卵泡生长过程中的 PI3K/AKT/mTOR 和 Erk1/2 信号通路^[43], 其在颗粒细胞增殖、凋亡和类固醇生成中发挥重要作用。这些结果为研究卵泡生长发育增添了新的视角, 丰富了 EVs 中 microRNA 与卵泡闭锁相关研究。

卵泡闭锁是结缔组织生长因子 (CTGF) 参与的复杂精细调控的生物学过程^[46-47]。在体外上调闭锁卵泡中的 miR-10a-5p, 促进颗粒细胞凋亡。同时, 在猪颗粒细胞凋亡和卵泡闭锁过程中, 还有 circRNA 调节 CTGF 通路, 即 circRNA/miR-10a-5p/CTGF 颗粒细胞凋亡途径, 为 circRNAs 在卵巢生理功能调节中的作用提供了新的见解。除此之外, 更多更深入的研究已经应用全基因组深度环状 RNA 测序来筛选健康和早期闭锁的猪卵巢腔卵泡中的环状 RNA^[46], 为卵泡闭锁起始阶段的转录组谱提供

了有价值的参考。

3.2 卵泡液 EVs 携带的 microRNA 通过卵母细胞调控卵泡闭锁

卵泡液 EVs 参与卵母细胞生长发育的信号通路^[28,53], 这与 EVs 携带的生物分子有关。最新研究表明, 卵泡液 EVs 改善了玻璃化卵母细胞的减数分裂恢复, 并可作为一种工具来改善配子低温保存。卵泡液 EVs 能够调节卵泡生长、卵母细胞能量代谢、卵母细胞成熟、应激反应和细胞间的通讯^[23]。这证明卵泡液 EVs 可能在卵母细胞发育和卵泡发育状态之间发挥重要作用, 可能参加了卵泡闭锁的相关调控。

近年来, 研究人员开启了在 EVs 中携带 microRNA、siRNA、CRISPR-cas9 复合物和蛋白质等特定分子的可能性的研究, 为 EVs 存在更多应用与功能开辟了新的前景。ANCs 与 APCs 的实验对比分析显示^[15], 从 ANC 卵泡液中分离的 EVs 中 miR-2285、miR-451、miR-132、miR-486 和 miR-874 下调, 这些 microRNA 参与了多种途径, 包括 TGF- β 信号通路, 这与卵母细胞和胚胎发育有关。miR-204、miR-197、

表 2 卵泡液 EVs 中 microRNA 对颗粒细胞的调控

Table 2 Regulation of granulosa cells by microRNA carried by extracellular vesicles (EVs) in follicular fluid

microRNA	Targets	Function	References
miR-26b	<i>HAS2</i>	Promote GCs apoptosis	[38]
miR-181b	<i>SMAD7</i>	Can inhibit SMAD7 by activating TGF- β pathway inhibition, thereby inhibiting GCs apoptosis	[41]
miR-146b	<i>CYP19A1</i>	Reduce the proliferation ability of bovine cumulus cells and significantly increase the rate of apoptosis of cumulus cells	[42]
miR-29	<i>PTX3</i>	Involved in the PI3K/AKT/mTOR and Erk1/2 signaling pathways, and plays an important role in GCs proliferation, apoptosis and steroid production	[43]
miR-222	<i>THBS1</i>	Inhibit GCs apoptosis	[44]
miR-375	<i>BMPR2</i>	Inhibit GCs apoptosis	[45]
miR-10a-5p	<i>CTGF</i>	Promote GCs apoptosis	[46]

miR-146b、miR-30d 和 miR-383 在卵泡液中的水平较低, 会下调 PI3K-Akt 信号通路中的几个基因, 该信号通路与卵泡功能相关, 可以控制卵泡和卵母细胞的生长和存活^[51]。因此, 通过下调 miR-204、miR-197、miR-146b、miR-30 和 miR-383, 直接影响了卵泡闭锁。在不同的发情周期阶段, EVs 携带的 microRNA 含量是不同的^[54]。生物毒性物质对卵泡闭锁有重要的影响。最近研究发现, 两种生物毒性物质邻苯二甲酸盐和苯酚的浓度与卵巢卵泡液中 EVs 携带的 8 种 microRNA 表达量相关, 即 let-7c、miR-375、miR-24、miR-19a、miR-125b、miR-106b、miR-374a 和 miR-15b^[48]。因此, 这些 microRNA 表达量的改变也会调控卵泡闭锁, 但是, 其中的具体机制还有待研究。

3.3 卵泡液 EVs 携带的 microRNA 通过卵泡内膜细胞调控卵泡闭锁

有研究已经证实, microRNA 可以通过卵泡内膜细胞调控卵泡功能, 进而影响卵泡闭锁。目前相关的文献很少, 仅有的文献中报道的 microRNA 如下^[24,34]: miR-199a-5p、miR-150、miR-378、miR-155 和 miR-222。目前还尚未有更多更深入的研究去发现其中的具体作用机制, 还有待进一步探究。

牛卵泡液健康组和卵泡闭锁组的转录组分析发现大部分卵泡闭锁与细胞周期和 DNA 复制有关^[55]。在卵泡闭锁时, 细胞周期和 DNA 复制会停止, 而不是像颗粒细胞会表现出凋亡相关基因上调。在卵泡闭锁过程中, 内膜上几乎没有发现与细胞凋亡相关的指标。但也有研究发现, 在马卵泡内膜细胞中有两个显著上调的转录本, 分别是与排卵期间甾体样基因的转录抑制因子有关的 *NR4A2* 基因和介导卵母细胞成熟的 *EREG* 基因^[56]。卵泡内膜细胞可以通过与卵母细胞间的相互作用来调控卵泡闭锁。

4 卵泡液 EVs 中 microRNA 调控卵泡闭锁的关键途径

4.1 卵泡液 EVs 携带的 microRNA 诱导卵泡闭锁

卵泡液 EVs 携带的 microRNA 诱导卵泡闭锁作用的途径通过细胞生长因子、激素以及细胞凋亡调节系统发挥作用, 详细总结见表 3 和图 3。

4.1.1 表皮生长因子 EGF 和转化生长因子 TGF

表皮生长因子 EGF 是一种活性物质, 主要作用是促进皮肤细胞的增殖、分化, 加速新陈代谢。EGF 能显著促进卵泡颗粒细胞增殖和卵母细胞成熟。EGF 能对大、中、小卵泡产生明显作用, 而其他细胞因子没有这么强的激发作用。EGF 可以抑制大鼠颗粒细胞的卵泡刺激素 (FSH) 和雌激素的合成, 使卵泡内的雌激素和雄激素比值下降, 从而调控卵泡的闭锁^[57-59]。随着卵泡的发育与成熟, 转化生长因子 α (TGF- α) 表达逐渐减弱, 协同调控卵母细胞生长、卵泡细胞增殖分化和黄体细胞凋亡^[72]。转化生长因子 β (TGF- β) 诱导垂体分泌 FSH, 它和 FSH 共同促进卵泡发育^[73]。诸多研究表明, 很多 miRNA 能调控转化生长因子表达。其中, let-7a^[57]和 let-7g^[58]通过靶向 *TGFBR1* 和下调 TGF- β 信号通路来调节猪卵巢颗粒细胞凋亡, 诱导卵泡闭锁^[60]。miR-183-96-182 簇是哺乳动物卵巢功能所必需的多顺反子 miRNA 簇, SMAD4 通过抑制 *FoxO1*, 诱导 miR-183-96-182 簇抑制颗粒细胞凋亡, 由 TGF- β /SMAD 信号通路调节卵泡闭锁和雌性生殖^[61-62]。miR-361-5p 在闭锁过程中显著上调, 受 SMAD4 调控后下调。SMAD4 是 TGF- β 信号传导的中心细胞内介质。TGF- β 信号已被认为是颗粒细胞凋亡的中

心触发因素。SMAD4/miR-361-5p/VEGFA 调控网络在颗粒细胞凋亡和卵泡闭锁中发挥作用^[63]。miR-181b 是一种在猪卵泡闭锁期间下调的 microRNA, 下调的 miR-181b 可以抑制 SMAD7 和 TGF- β 信号通路来促进颗粒细胞凋亡^[64]。据报道, miR-29c、miR-143 和 miR-26b 也能通过 EGF 和 TGF 来调节卵泡闭锁^[65-67]。骨形态发生蛋白 15 (BMP15) 和生长分化因子 9 (GDF9) 是 TGF- β 超家族的成员。通过自分泌和旁分泌机制, 这两种因子可以局部调节卵巢中的细胞分化、增殖和其他功能, 过表达 miR-375 后显著增加颗粒细胞凋亡率和 BMP15/GDF9 受体的表达, 因此 miR-375 在卵泡生长、闭锁、排卵、受精、繁殖和维持中起着至关重要的作用^[45]。

4.1.2 雄激素

在卵泡的生长及发育过程中, 雄激素具有双重作用。适量的雄激素有利于卵泡的募集、生长及发育, 并且减少卵泡闭锁; 过量的雄激素会抑制卵泡生长, 诱导卵泡凋亡和闭锁, 最终发生排卵障碍。卵巢产生雄激素是雌二醇正常周期性分泌的必要条件, 对卵泡发育具有重

要作用, 还能促进颗粒细胞增殖。雄激素仅在成熟卵泡中促进细胞凋亡和随后的卵泡闭锁, 众多研究表明雄激素与卵泡闭锁之间的机制也可以由 microRNA 调控。其中, miR-143 通过抑制 HSD17 β 4、ER1 和 PTGS2 的类固醇生成相关基因, 负向调节雌激素和雄激素, 诱导细胞凋亡和卵泡闭锁^[68]。雄激素不足会降低 miR-125b 的表达, 通过核和核外信号通路来诱导卵泡闭锁, 进而增强促凋亡蛋白的表达。并且雄激素增强 FSH 受体表达, 从而促进 FSH 介导的卵泡生长和发育^[69]。除此之外, miR-23a/miR-27a 介导的细胞凋亡是通过 FasL-Fas 途径发生的, 抑制 miR-23a/miR-27a 的表达促进颗粒细胞凋亡, 诱导卵泡闭锁^[70]。miR-26a 还能通过调节促性腺激素释放激素的分泌来诱导卵泡闭锁, 但是具体机制不清楚^[71]。

4.2 卵泡液 EVs 携带的 microRNA 抑制卵泡闭锁

卵泡液 EVs 携带的 microRNA 抑制卵泡闭锁的途径同样是通过激素、细胞生长因子发挥作用, 详细总结结果见表 4 和图 3。

表 3 卵泡液 EVs 携带的 microRNA 诱导卵泡闭锁

Table 3 microRNA carried by extracellular vesicles (EVs) in follicular fluid induces follicular atresia

Impact factors	Targets	miRNA	Function	References
EGF/TGF	<i>TGFBR1</i>	let-7a; let-7g	Promote GCs apoptosis	[57-60]
	<i>FoxO1</i>	miR-183-96-182 cluster	Promote GCs apoptosis	[61-62]
	<i>VEGFA</i>	miR-361-5p	Regulate follicular atresia and GCs apoptosis	[63]
	<i>SMAD7</i>	miR-181b	Promote GC apoptosis	[64]
	<i>TGFBR2</i>	miR-29c	Regulate follicular atresia and GCs apoptosis	[65]
	<i>FSHR</i>	miR-143	Promote GC apoptosis and induce FSHR expression	[66]
	<i>SMAD4</i>	miR-26b	Promote GCs apoptosis	[67]
Androgen	<i>H3K27me3</i>	miR-143	Negatively regulate estrogen and androgen, induce GCs apoptosis	[68]
	<i>AR</i>	miR-125b	Promote the expression of pro-apoptotic proteins and enhance FSHR expression	[69]
Fas /FasL	<i>SMAD5</i>	miR-23a; miR-27a	Promote GCs apoptosis	[70]
GnRH	Unknown	miR-26a	Regulate GnRH expression	[71]

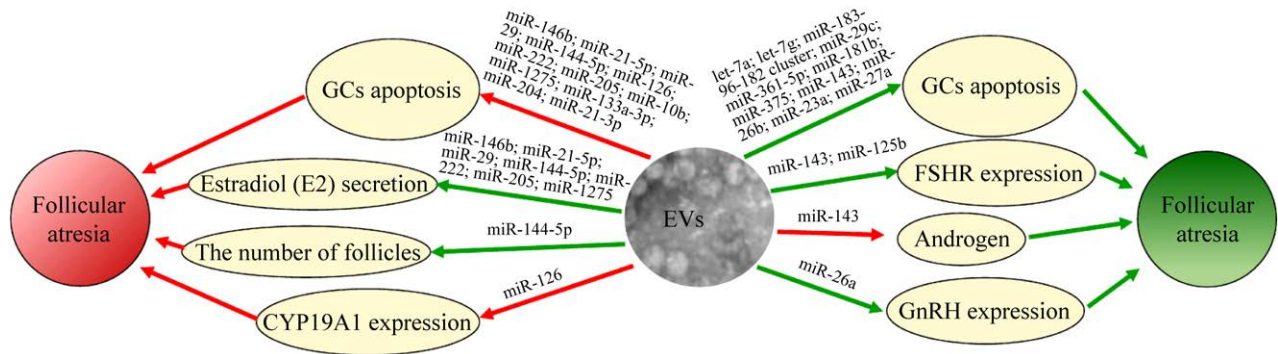


图3 卵泡液 EVs 中 microRNA 调控卵泡闭锁

Figure 3 microRNA carried by extracellular vesicles (EVs) in follicular fluid regulates follicular atresia. The green arrow and red arrow represent positive regulation and negative regulation, respectively.

4.2.1 雌激素

雌激素由雌性动物卵巢和胎盘分泌的，天然雌激素主要是雌二醇 (E2)、雌酮、雌三醇，其中，雌二醇生物活性最强，研究最多。目前已经发现很多 miRNA 能调控雌激素，从而调控卵泡闭锁。miR-1275 是猪卵巢卵泡闭锁期间差异表达的 microRNA 之一^[74]。miR-1275 通过直接与 3'UTR 结合降低 LRH-1 的表达，阻止了 LRH-1 蛋白与 *CYP19A1* 启动子的相互作用，抑制雌二醇合成，促进颗粒细胞凋亡，并导致猪卵巢卵泡闭锁。骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 衍生的外泌体通过传递 miR-144-5p 来治疗大鼠的卵泡闭锁，通过添加 miR-144-5p 促进大鼠卵泡数量，增加 E2 分泌，减少颗粒细胞凋亡^[75]。全基因组分析和定量实时 PCR 显示，miR-146b 在卵泡闭锁期间显著上调^[42]。miR-146b 是一种保守且富含卵巢的 miRNA，miR-146b 直接靶向 E2 合成信号的关键酶 *CYP19A1*，调节猪的 E2 分泌、颗粒细胞凋亡和卵泡闭锁。此外，miR-146b 与 *CYP19A1* 的 3'非翻译区相互作用以阻止翻译，从而调节 *CYP19A1* 介导的 E2 分泌和颗粒细胞凋亡^[42]。miR-21-5p 的增加能抑制颗粒细胞凋亡、

增加血清 E2^[76]。miR-29 通过激活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路靶向 *PTX3*，抑制 E2 生成、抑制 *CYP19A1*、*CYP11A1*、*StAR* 和 *HSD3B* 的表达和抑制细胞凋亡^[43]。SMAD4 诱导 *CYP19A1* 表达 (编码芳香酶，雌激素生物合成的关键酶)，并且 SMAD4 通过 miR-126/FSHR 轴抑制颗粒细胞凋亡和卵泡闭锁^[77]。miR-222 模拟物促进雌激素水平，抑制颗粒细胞凋亡^[44]。降低 miR-205 表达能显著抑制小鼠颗粒细胞凋亡，并促进雌激素分泌^[78]。

4.2.2 胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factor, IGF)

胰岛素样生长因子 IGF 是一种神经营养因子，IGF-I、IGF-II 及其各自的受体和胰岛素生长因子结合蛋白构成了 IGF 系统。IGF 45% 的分子结构与胰岛素相似，在受体和功能方面与胰岛素类似。胰岛素样生长因子结合蛋白 (insulin-like growth factor binding proteins, IGFBP) 调节 IGF 与受体结合，调节 IGF-I 的生物活性，能抑制过多的雄激素产生，抑制卵泡闭锁^[84]。IGFBP 是一种闭锁因子，能抑制颗粒细胞凋亡来抑制卵泡闭锁^[85]。miR-10b 通过 PI3K/AKT 通路和 IGF I 调控牛颗粒细胞凋亡^[79-80]。猪卵泡 miR-133a-3p

下调会抑制 G1 和 G2/M 期的运转,以及类固醇激素代谢,有助于颗粒细胞周期运转,减少颗粒细胞凋亡,抑制卵泡闭锁^[81]。通过磷酸肌醇 3-激酶 (PI3K) 和蛋白激酶 B (PKB/Akt) 途径, IGF1 抑制颗粒细胞凋亡^[86]。鸡萎缩的卵巢中下调 miR-204 能通过 IGF 调控 PI3K/AKT/mTOR 通路,增强 *FOXK2* 表达,抑制颗粒细胞凋亡,抑制卵泡闭锁^[82]。IGF 不是单一发挥作用的,研究发现 IGF-I、IGFBP-1、IGFBP-2、IGFBP-4、IGFBP-5 和 IGFBP-6 能与促性腺激素互作, IGF-I、IGFBP-1、IGFBP-2、IGFBP-3 和 IGFBP-4 能与雌激素/孕激素互作,最终调控卵泡发育和闭锁^[87]。

4.2.3 成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF)

成纤维细胞生长因子 FGF 是一种多肽,由垂体和下丘脑分泌,包括 7 个成员: hst/ks3、bFGF、aFGF、int-2、FGF-5、FGF-6 以及 FGF-7,它们之间的同源性达到 35%–55%,不同种属间成纤维细胞生长因子也有很高的同源性。其中, bFGF 主要来源于黄体细胞和颗粒细胞,能促进颗粒细胞增殖,减少颗粒细胞凋亡,参与卵泡发育和生长。也有研究表明, FGF 能调控颗粒细胞状态来控制卵泡闭锁, miR-21-3p 直接靶向

FGF2, 通过抑制 AKT/mTOR 信号传导来抑制牛颗粒细胞自噬,抑制卵泡闭锁^[83]。

5 卵泡液 EVs 中的 microRNA 对于生殖调控及其生殖疾病诊断的研究展望

EVs 能够从其他细胞中携带和转移不同的大分子,并通过这种方式影响受体细胞的功能。在不同的生物大分子中,研究最多的是 microRNA。microRNA 是一类参与基因表达调控的非编码 RNA 大家族。笔者所在实验室使用碘克沙醇密度梯度离心法将 sEVs 进一步区分亚型,得到两层密度不同 sEVs 亚型,分别命名为高密度细胞外囊泡 (HD-sEVs 或 sEVs_F8) 和低密度细胞外囊泡 (LD-sEVs 或 sEVs_F6)。笔者实验室对卵泡液中 HD-sEVs 和 LD-sEVs 进行 microRNA 测序分析,其富集的 microRNA 见表 5,可以看出不同 EVs 亚型之间 microRNA 差异极大。目前,实验室正着力于研究特定 microRNA 对卵泡发育、卵泡闭锁、颗粒细胞增殖和凋亡的影响,部分 microRNA 的功能得到验证,为卵泡发育机制研究提供了新的方向和认识^[88]。深入理解 microRNA 网络的作用,不仅有助于理解颗粒细胞凋亡与卵泡发育、闭锁之间的机制,

表 4 卵泡液 EVs 携带的 microRNA 抑制卵泡闭锁

Table 4 microRNA carried by extracellular vesicles (EVs) in follicular fluid inhibits follicular atresia

Impact factor	Target	miRNA	Function	References
Estrogen	<i>CYP19A1</i>	miR-1275	Inhibit GCs apoptosis and increase serum estradiol	[74]
	<i>PTEN</i>	miR-144-5p	Promote the number of follicles, increase estradiol secretion and reduce GCs apoptosis	[75]
	<i>Smad7</i>	miR-21-5p	Inhibit GCs apoptosis and increase serum estradiol	[76]
	<i>FSHR</i>	miR-126	Induce CYP19A1 expression	[77]
	<i>CREB1</i>	miR-205	Inhibit GCs apoptosis and regulate estradiol secretion	[78]
	<i>CYP19A1</i>	miR-10b	Inhibit follicular atresia	[79]
IGF	<i>IGF1</i>	miR-133a-3p; miR-10b	Inhibit GCs apoptosis	[79-81]
	<i>FOXK2</i>	miR-204	Inhibit GCs apoptosis	[82]
FGF	<i>FGF2</i>	miR-21-3p	Inhibit AKT/mTOR signaling and inhibit GCs apoptosis	[83]

表 5 牛卵泡液 EVs 亚型携带的差异 microRNA^[88]Table 5 Differential microRNA carried by extracellular vesicles (EVs) subtypes in bovine follicular fluid^[88]

Differentially expressed microRNAs	Gene ID
sEVs_F6	bta-miR-26c; bta-let-7c; bta-let-7d; bta-let-7b; bta-miR-151-5p; bta-miR-7; bta-miR-34a; bta-miR-16b; bta-miR-15b; bta-miR-497; bta-miR-16a; bta-miR-125b; bta-miR-449a; bta-miR-204; bta-miR-574; bta-miR-127; bta-miR-3601; bta-miR-31; bta-miR-195; bta-let-7e; bta-miR-139; bta-miR-342; bta-miR-125a; bta-miR-30d; bta-miR-224; bta-miR-3432a; bta-miR-379; bta-miR-28; bta-miR-21-5p; bta-miR-455-3p; bta-miR-199b; bta-miR-145; bta-miR-199a-5p; bta-miR-193a-3p; bta-miR-1271; bta-miR-103; bta-miR-30e-5p; bta-miR-200a; bta-miR-33a; bta-miR-507b; bta-miR-362-5p; bta-miR-181b; bta-miR-339a; bta-miR-135a; bta-miR-340; bta-miR-153; bta-miR-491; bta-miR-196b; bta-miR-339b; bta-miR-2387; bta-miR-12023; bta-miR-182; bta-miR-345-5p; bta-miR-148c; bta-miR-708; bta-miR-181d; bta-miR-23b-3p; bta-miR-29b; bta-miR-96; bta-miR-500; bta-miR-206; bta-miR-29c; bta-miR-769; bta-miR-2898; bta-miR-2320-5p; bta-miR-495; bta-miR-223; bta-miR-331-3p; bta-miR-141; bta-miR-2284t-3p; bta-miR-1260b; bta-miR-2904; bta-miR-27a-5p; bta-miR-23b-5p; bta-miR-1249; bta-let-7i; bta-miR-26a; bta-miR-26b; bta-miR-98; bta-miR-374b; bta-miR-3604; bta-miR-411a; bta-miR-126-3p; bta-miR-10174-3p; bta-miR-99b; bta-miR-30b-5p; bta-miR-155; bta-miR-507-3p; bta-miR-30c; bta-miR-450a; bta-miR-451; bta-miR-17-5p; bta-miR-3613a; bta-miR-181a; bta-miR-151-3p; bta-miR-30a-5p; bta-miR-1; bta-miR-374a; bta-miR-383; bta-miR-194; bta-miR-126-5p; bta-miR-6120-3p; bta-miR-30f; bta-miR-2336; bta-miR-376b; bta-miR-6119-5p; bta-miR-450b; bta-miR-411b; bta-miR-505; bta-miR-411c-3p; bta-miR-2285bf; bta-miR-142-5p
sEVs_F8	bta-miR-92a; bta-miR-424-5p; bta-miR-6123; bta-miR-93; bta-miR-660; bta-miR-128; bta-miR-19b; bta-miR-10b; bta-miR-2284y; bta-miR-335; bta-miR-380-3p; bta-miR-2284x; bta-let-7a-3p; bta-miR-2284ab; bta-miR-423-5p; bta-miR-1307; bta-miR-20a; bta-miR-423-3p; bta-miR-484; bta-miR-2299-3p; bta-miR-425-3p; bta-miR-152; bta-miR-2285av; bta-miR-130a; bta-miR-410; bta-miR-671; bta-miR-369-3p; bta-miR-382; bta-miR-19a; bta-miR-376a; bta-miR-2284aa; bta-miR-2483-3p; bta-miR-2284w; bta-miR-2285y; bta-miR-138; bta-miR-11986b; bta-miR-6522; bta-miR-6517; bta-miR-2285bc; bta-miR-760-3p; bta-miR-12031; bta-miR-2285ci; bta-miR-2313-3p; bta-miR-130b; bta-miR-2284h-5p; bta-miR-2285u; bta-miR-132; bta-miR-767; bta-miR-188; bta-miR-2285aj-5p; bta-miR-2285ak-5p; bta-miR-2382-5p; bta-miR-376d; bta-miR-2285bz; bta-miR-1197; bta-miR-2285m; bta-miR-2285p; bta-miR-2376; bta-miR-409b; bta-miR-365-5p; bta-miR-326; bta-miR-2382-3p; bta-miR-323b-3p; bta-miR-6536; bta-miR-3154; bta-miR-9851; bta-miR-2367-3p; bta-miR-656; bta-miR-20b; bta-miR-2285be; bta-miR-124a; bta-miR-346; bta-miR-124b; bta-miR-2284m; bta-miR-12015; bta-miR-2450a

也为不孕症和其他卵巢功能障碍的诊断和治疗提供新的策略。卵母细胞-颗粒细胞-膜细胞严格的相互作用调控卵泡的生长发育,细胞与细胞之间通过各种分子信号作为桥梁,在卵泡液中构建成了庞大的信息交流枢纽,其中, microRNA 的作用不可忽视。研究表明,前列腺癌细胞与骨细胞通过 EVs 中 RNA 进行潜在交流^[89],这些交流作用对多种信号通路具有显著影响,在

细胞内各种不同的生理过程中起调节作用,能够作用于颗粒细胞和卵泡内膜细胞^[90],继而通过细胞机制来调控卵泡闭锁的进程。总之,卵泡液 EVs 中 microRNA 在卵泡液微环境中起细胞间通讯作用^[7,91]。

从细胞释放开始,成熟的 microRNA 就参与到细胞间的信息传递中。事实上,对卵泡液中 EVs 的鉴定及其携带的 microRNA 的研究可

以探索生殖疾病的诊断, 为辅助生殖治疗提供卵母细胞质量检测的生物标志物, 为哺乳类动物生殖生物学研究以及相关繁殖障碍的预警、预防提供依据^[92]。

结合国内外研究现状和本实验室已经开展的卵泡液细胞外囊泡的系列研究, 对卵泡液 EVs 中 microRNA 参与生殖调控及生殖疾病诊断需要开展以下工作: (1) 卵泡液 EVs 中 microRNA 与卵泡发育以及超数排卵效果的关联研究。(2) 卵泡闭锁或者卵泡发育不良与卵泡液 EVs 中 microRNA 的关联研究。(3) 卵泡液 EVs 在卵泡发育过程中颗粒细胞、卵母细胞以及膜间质细胞之间互作与细胞信息传递过程中 microRNA 作用, 卵泡液 EVs 中 microRNA 是如何调控细胞通信并影响受体细胞的基因表达和功能改变? (4) 卵泡液 EVs 中除 microRNA 以外, 携带的其他生物成分发挥了什么功能? 这些成分对卵泡闭锁、生殖调控及其生殖疾病诊断有什么意义? (5) 卵泡液 EVs 可以穿越生物屏障, 它是否可以作为药物载体参与卵泡闭锁、生殖调控及生殖疾病治疗? 卵泡液 EVs 中 microRNA 是否可以作为生殖疾病发病机制、诊断、预后和治疗的生物标志物? (6) 在卵泡发育不同阶段, 不同物种间卵泡液 EVs 中 microRNA 表达谱的差异分析以及可能参与的生殖调控通路研究等。

理解卵泡液 EVs 发挥作用的分子和细胞机制, 了解卵泡液 EVs 中 microRNA 如何通过细胞机制调节卵泡闭锁的发生, 对于选择最佳质量的生殖细胞具有重要的临床意义, 对于畜牧繁殖技术和人类辅助生殖技术发展具有理论指导, 可为卵泡发育调控提供新的研究方向和思路。

REFERENCES

- [1] Matsuda F, Inoue N, Manabe N, et al. Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. *J Reprod Dev*, 2012, 58(1): 44-50.
- [2] Yu YS, Sui HS, Han ZB, et al. Apoptosis in granulosa cells during follicular atresia: relationship with steroids and insulin-like growth factors. *Cell Res*, 2004, 14(4): 341-346.
- [3] Zhang JB, Xu YX, Liu HL, et al. microRNAs in ovarian follicular atresia and granulosa cell apoptosis. *Reprod Biol Endocrinol*, 2019, 17(1): 9.
- [4] Vader P, Breakefield XO, Wood MJA. Extracellular vesicles: emerging targets for cancer therapy. *Trends Mol Med*, 2014, 20(7): 385-393.
- [5] Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*, 2013, 200(4): 373-383.
- [6] Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2014, 30: 255-289.
- [7] Aiello A, Giannesi F, Percario ZA, et al. An emerging interplay between extracellular vesicles and cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2020, 51: 49-60.
- [8] Chung IM, Rajakumar G, Venkidasamy B, et al. Exosomes: current use and future applications. *Clin Chim Acta*, 2020, 500: 226-232.
- [9] Delauzun V, Amigues B, Gaubert A, et al. Extracellular vesicles as a platform to study cell-surface membrane proteins. *Methods*, 2020, 180: 35-44.
- [10] Becker A, Thakur BK, Weiss JM, et al. Extracellular vesicles in cancer: cell-to-cell mediators of metastasis. *Cancer Cell*, 2016, 30(6): 836-848.
- [11] Yáñez-Mó M, Siljander PRM, Andreu Z, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*, 2015, 4: 27066.
- [12] Skotland T, Sagini K, Sandvig K, et al. An emerging focus on lipids in extracellular vesicles. *Adv Drug Deliv Rev*, 2020, 159: 308-321.
- [13] 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 (in Chinese).
- [14] Hung WT, Hong X, Christenson LK, et al.

- Extracellular vesicles from bovine follicular fluid support cumulus expansion. *Biol Reprod*, 2015, 93(5): 117.
- [15] Hailay T, Hoelker M, Poirier M, et al. Extracellular vesicle-coupled miRNA profiles in follicular fluid of cows with divergent post-calving metabolic status. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 12851.
- [16] 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.
- [17] 丁强, 李亚新, 陈玉林. 山羊卵巢卵泡液中外泌体分离鉴定及其对颗粒细胞的影响. 中国畜牧兽医学会养羊学分会会议论文集. 石家庄: 中国畜牧兽医, 2017: 129.
- [18] Grzesiak M, Popiolek K, Knapczyk-Stwora K. Extracellular vesicles in follicular fluid of sexually mature gilts' ovarian antral follicles-identification and proteomic analysis. *J Physiol Pharmacol*, 2020, 71(1): 2020Feb; 71(1).
- [19] Matsuno Y, Kanke T, Maruyama N, et al. Characterization of mRNA profiles of the exosome-like vesicles in porcine follicular fluid. *PLoS One*, 2019, 14(6): e0217760.
- [20] Matsuno Y, Onuma A, Fujioka YA, et al. Effects of exosome-like vesicles on cumulus expansion in pigs *in vitro*. *J Reprod Dev*, 2017, 63(1): 51-58.
- [21] Simon C, Greening DW, Bolumar D, et al. Extracellular vesicles in human reproduction in health and disease. *Endocr Rev*, 2018, 39(3): 292-332.
- [22] Machtinger R, Laurent LC, Baccarelli AA. Extracellular vesicles: roles in gamete maturation, fertilization and embryo implantation. *Hum Reprod Update*, 2016, 22(2): 182-193.
- [23] De Almeida Monteiro Melo Ferraz M, Fujihara M, Nagashima JB, et al. Follicular extracellular vesicles enhance meiotic resumption of domestic cat vitrified oocytes. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 8619.
- [24] Da Silveira JC, Veeramachaneni DNR, Winger QA, et al. Cell-secreted vesicles in equine ovarian follicular fluid contain miRNAs and proteins: a possible new form of cell communication within the ovarian follicle. *Biol Reprod*, 2012, 86(3): 71.
- [25] 付衍辉. 猪卵泡闭锁过程中部分相关基因表达特征研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2011.
- Fu YH. The expression characteristics of partial gene during the porcine follicular atresia[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2011 (in Chinese).
- [26] Brzyski RG, Muasher SJ, Droesch K, et al. Follicular atresia associated with concurrent initiation of gonadotropin-releasing hormone agonist and follicle-stimulating hormone for oocyte recruitment. *Fertil Steril*, 1988, 50(6): 917-921.
- [27] Taya K, Sasamoto S. Selective release of FSH in lactating rats during the period of follicular atresia induced by the administration of antiserum to LH-releasing hormone. *J Endocrinol*, 1988, 118(3): 455-464.
- [28] 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.
- [29] Ana Clara Faquinesi Cavalcante Mendes De Ávila, Bridi A, Andrade GM, et al. Estrous cycle impacts microRNA content in extracellular vesicles that modulate bovine cumulus cell transcripts during *in vitro* maturation. *Biol Reprod*, 2019, 102(2): 362-375.
- [30] 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.
- [31] Donadeu FX, Mohammed BT, Ioannidis J. A miRNA target network putatively involved in follicular atresia. *Domest Anim Endocrinol*, 2017, 58: 76-83.
- [32] Sohel MMH, 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.
- [33] Da Silveira J, Andrade GM, Perecin F, et al. Isolation and analysis of exosomal microRNAs from ovarian follicular fluid. *Methods Mol Biol*, 2018, 1733: 53-63.
- [34] Kamalidehghan B, Habibi M, Afjeh SS, et al. The importance of small non-coding RNAs in human reproduction: a review article. *Appl Clin Genet*, 2020, 13: 1-11.
- [35] 梁学超, 蒋明, 罗玉茹, 等. 猪卵巢发育的组织学变化及卵泡闭锁规律研究. 畜牧兽医学报, 2017, 48(10): 1863-1870.
- Liang XC, Jiang M, Luo YR, et al. Study on histology and patterns of follicular atresia during ovarian development in pig. *Chin J Animal Vet Sci*, 2017, 48(10): 1863-1870 (in Chinese).
- [36] Andronico F, Battaglia R, Ragusa M, et al.

- Extracellular vesicles in human oogenesis and implantation. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(9): 2162.
- [37] 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.
- [38] 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.
- [39] 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.
- [40] Da Silveira JC, Carnevale EM, Winger QA, et al. Regulation of ACVR1 and ID2 by cell-secreted exosomes during follicle maturation in the mare. *Reprod Biol Endocrinol*, 2014, 12: 44.
- [41] Yao W, Pan ZX, Du X, et al. miR-181b-induced SMAD7 downregulation controls granulosa cell apoptosis through TGF- β signaling by interacting with the TGFBR1 promoter. *J Cell Physiol*, 2018, 233(9): 6807-6821.
- [42] Li Q, Du X, Liu L, et al. Upregulation of miR-146b promotes porcine ovarian granulosa cell apoptosis by attenuating CYP19A1. *Domest Anim Endocrinol*, 2021, 74: 106509.
- [43] Wang PJ, Liu SJ, Zhu C, et al. miR-29 regulates the function of goat granulosa cell by targeting PTX3 via the PI3K/AKT/mTOR and Erk1/2 signaling pathways. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2020, 202: 105722.
- [44] Zhu WH, Yang M, Shang JN, et al. miR-222 inhibits apoptosis in porcine follicular granulosa cells by targeting the THBS₁ gene. *Anim Sci J*, 2019, 90(6): 719-727.
- [45] Chen HY, Liu C, Jiang H, et al. Regulatory role of miRNA-375 in expression of BMP15/GDF9 receptors and its effect on proliferation and apoptosis of bovine cumulus cells. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41(2): 439-450.
- [46] Guo TY, Zhang JB, Yao W, et al. CircINHA resists granulosa cell apoptosis by upregulating CTGF as a *CeRNA* of miR-10a-5p in pig ovarian follicles. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 2019, 1862(10): 194420.
- [47] Battaglia R, Musumeci P, Ragusa M, et al. Ovarian aging increases small extracellular vesicle CD81⁺ release in human follicular fluid and influences miRNA profiles. *Aging*, 2020, 12(12): 12324-12341.
- [48] Martinez RM, Hauser R, Liang LM, et al. Urinary concentrations of phenols and phthalate metabolites reflect extracellular vesicle microRNA expression in follicular fluid. *Environ Int*, 2019, 123: 20-28.
- [49] Xiao GY, Cheng CC, Chiang YS, et al. Exosomal miR-10a derived from amniotic fluid stem cells preserves ovarian follicles after chemotherapy. *Sci Rep*, 2016, 6: 23120.
- [50] Sun B, Ma YJ, Wang F, et al. miR-644-5p carried by bone mesenchymal stem cell-derived exosomes targets regulation of p53 to inhibit ovarian granulosa cell apoptosis. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 360.
- [51] Pasquariello R, Manzoni EFM, Fiandanese N, et al. Implications of miRNA expression pattern in bovine oocytes and follicular fluids for developmental competence. *Theriogenology*, 2020, 145: 77-85.
- [52] Guo TY, Huang L, Yao W, et al. The potential biological functions of circular RNAs during the initiation of atresia in pig follicles. *Domest Anim Endocrinol*, 2020, 72: 106401.
- [53] Tesfaye D, Hailay T, Salilew-Wondim D, et al. Extracellular vesicle mediated molecular signaling in ovarian follicle: implication for oocyte developmental competence. *Theriogenology*, 2020, 150: 70-74.
- [54] De Ávila A, Bridi A, Andrade GM, et al. Estrous cycle impacts microRNA content in extracellular vesicles that modulate bovine cumulus cell transcripts during *in vitro* maturation. *Biol Reprod*, 2020, 102(2): 362-375.
- [55] Hatzirodos N, Hummitzsch K, Irving-Rodgers HF, et al. Transcriptome profiling of the theca interna in transition from small to large antral ovarian follicles. *PLoS One*, 2014, 9(5): e97489.
- [56] Donadeu FX, Fahiminiya S, Esteves CL, et al. Transcriptome profiling of granulosa and theca cells during dominant follicle development in the horse. *Biol Reprod*, 2014, 91(5): 111.
- [57] 张家庆, 王献伟, 李文嘉, 等. 猪 let-7a 靶基因预测及生物信息学分析. *家畜生态学报*, 2020, 41(4): 14-21.
- Zhang JQ, Wang XW, Li WJ, et al. Target gene prediction and bioinformatics analysis of ssc-let-7a. *J Domest Animal Ecol*, 2020, 41(4): 14-21 (in Chinese).
- [58] Zhou JL, Liu JY, Pan ZX, et al. The let-7g microRNA promotes follicular granulosa cell apoptosis by targeting transforming growth factor- β type 1 receptor. *Mol Cell Endocrinol*, 2015, 409: 103-112.
- [59] Chun SY, Eisenhauer KM, Minami S, et al. Hormonal

- regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinology*, 1996, 137(4): 1447-1456.
- [60] Cao R, Wu WJ, Zhou XL, et al. Expression and preliminary functional profiling of the let-7 family during porcine ovary follicle atresia. *Mol Cells*, 2015, 38(4): 304-311.
- [61] Yao W, Wang S, Du X, et al. SMAD4 inhibits granulosa cell apoptosis via the miR-183-96-182 cluster and FoxO1 axis. *Reprod Sci*, 2021: 2021Jul21.
- [62] Yao W, Pan ZX, Du X, et al. NORHA, a novel follicular atresia-related lncRNA, promotes porcine granulosa cell apoptosis via the miR-183-96-182 cluster and FoxO1 axis. *J Anim Sci Biotechnol*, 2021, 12(1): 103.
- [63] Ma MN, Zhang JB, Gao XM, et al. miR-361-5p mediates SMAD4 to promote porcine granulosa cell apoptosis through VEGFA. *Biomolecules*, 2020, 10(9): 1281.
- [64] Yao W, Pan ZX, Du X, et al. miR-181b-induced SMAD7 downregulation controls granulosa cell apoptosis through TGF- β signaling by interacting with the TGFBR1 promoter. *J Cell Physiol*, 2018, 233(9): 6807-6821.
- [65] Du X, Liu L, Wu WJ, et al. SMARCA2 is regulated by NORFA/miR-29c, a novel pathway related to female fertility, controls granulosa cell apoptosis. *J Cell Sci*, 2020: 133(23): 249961.
- [66] Du X, Zhang LF, Li XY, et al. TGF- β signaling controls FSHR signaling-reduced ovarian granulosa cell apoptosis through the SMAD4/miR-143 axis. *Cell Death Dis*, 2016, 7(11): e2476.
- [67] 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.
- [68] Zhong YY, Li LY, Chen ZT, et al. MIR143 inhibits steroidogenesis and induces apoptosis repressed by H3K27me3 in granulosa cells. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 565261.
- [69] Sen A, Prizant H, Light A, et al. Androgens regulate ovarian follicular development by increasing follicle stimulating hormone receptor and microRNA-125b expression. *PNAS*, 2014, 111(8): 3008-3013.
- [70] Nie MY, Yu S, Peng S, et al. miR-23a and miR-27a promote human granulosa cell apoptosis by targeting SMAD5. *Biol Reprod*, 2015, 93(4): 98.
- [71] Huo SW, Qi HR, Si YX, et al. microRNA 26a targets Ezh2 to regulate apoptosis in mouse ovarian granulosa cells. *Syst Biol Reprod Med*, 2021, 67(3): 221-229.
- [72] Glamoclija V, Vilović K, Saraga-Babić M, et al. Apoptosis and active caspase-3 expression in human granulosa cells. *Fertil Steril*, 2005, 83(2): 426-431.
- [73] Reynaud K, Driancourt MA. Oocyte attrition. *Mol Cell Endocrinol*, 2000, 163(1/2): 101-108.
- [74] Liu JY, Li XY, Yao Y, et al. miR-1275 controls granulosa cell apoptosis and estradiol synthesis by impairing LRH-1/CYP19A1 axis. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 2018, 1861(3): 246-257.
- [75] Yang ML, Lin L, Sha CL, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomal miR-144-5p improves rat ovarian function after chemotherapy-induced ovarian failure by targeting PTEN. *Lab Invest*, 2020, 100(3): 342-352.
- [76] Zhang XD, Chen YG, Yang M, et al. miR-21-5p actions at the *Smad7* gene during pig ovarian granulosa cell apoptosis. *Anim Reprod Sci*, 2020, 223: 106645.
- [77] Li QQ, Du X, Liu L, et al. miR-126* is a novel functional target of transcription factor SMAD4 in ovarian granulosa cells. *Gene*, 2019, 711: 143953.
- [78] Zhang P, Wang J, Lang H, et al. microRNA-205 affects mouse granulosa cell apoptosis and estradiol synthesis by targeting CREB1. *J Cell Biochem*, 2018: 2018Dec16.
- [79] Guo LW, Huang QX, Zhao J, et al. microRNA-10b promotes the apoptosis of bovine ovarian granulosa cells by targeting plasminogen activator inhibitor-1. *Theriogenology*, 2021, 176: 206-216.
- [80] Li QQ, Du X, Pan ZX, et al. The transcription factor SMAD4 and miR-10b contribute to E2 release and cell apoptosis in ovarian granulosa cells by targeting CYP19A1. *Mol Cell Endocrinol*, 2018, 476: 84-95.
- [81] 陈慧芳, 黄绮亮, 胡智超, 等. 外泌体 microRNA 在猪成熟和闭锁卵泡中的表达差异及功能分析. *中国农业科学*, 2021, 54(21): 4664-4676.
- Chen HF, Huang QL, Hu ZC, et al. Expression differences and functional analysis of exosomes microRNA in porcine mature and atretic follicles. *Sci Agric Sin*, 2021, 54(21): 4664-4676 (in Chinese).
- [82] Cui ZF, Liu LB, Kwame Amevor F, et al. High expression of miR-204 in chicken atrophic ovaries promotes granulosa cell apoptosis and inhibits autophagy. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 580072.
- [83] Ma LZ, Tang XR, Guo S, et al. miRNA-21-3p targeting of FGF₂ suppresses autophagy of bovine ovarian granulosa cells through AKT/mTOR pathway. *Theriogenology*, 2020, 157: 226-237.

- [84] Andreu-Vieyra CV, Habibi HR. Factors controlling ovarian apoptosis. *Can J Physiol Pharmacol*, 2000, 78(12): 1003-1012.
- [85] Singh J, Paul A, Thakur N, et al. Localization of IGF proteins in various stages of ovarian follicular development and modulatory role of IGF-I on granulosa cell steroid production in water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Anim Reprod Sci*, 2015, 158: 31-52.
- [86] Duan CM, Xu QJ. Roles of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins in regulating IGF actions. *Gen Comp Endocrinol*, 2005, 142(1/2): 44-52.
- [87] 姚郅臻, 司文字, 方富贵. IGF 系统与雌性哺乳动物生殖. *生理科学进展*, 2019, 50(3): 211-215.
Yao ZQ, Si WY, Fang FG. IGF system and reproduction in female mammals. *Prog Physiol Sci*, 2019, 50(3): 211-215 (in Chinese).
- [88] Wang XM, Meng K, Wang HQ, et al. Identification of small extracellular vesicle subtypes in follicular fluid: insights into the function and miRNA profiles. *J Cell Physiol*, 2021, 236(8): 5633-5645.
- [89] Probert C, Dottorini T, Speakman A, et al. Communication of prostate cancer cells with bone cells via extracellular vesicle RNA: a potential mechanism of metastasis. *Oncogene*, 2019, 38(10): 1751-1763.
- [90] Zielak-Steciwko AE, Browne JA. How to explore the function and importance of microRNAs: microRNAs expression profile and their target/pathway prediction in bovine ovarian cells. *Methods Mol Biol*, 2018, 1733: 93-105.
- [91] Bayraktar R, Van Roosbroeck K, Calin GA. Cell-to-cell communication: microRNAs as hormones. *Mol Oncol*, 2017, 11(12): 1673-1686.
- [92] Martinez RM, Baccarelli AA, Liang LM, et al. Body mass index in relation to extracellular vesicle-linked microRNAs in human follicular fluid. *Fertil Steril*, 2019, 112(2): 387-396.e3.

(本文责编 陈宏宇)