

• 论 著 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2023.15.009

## miRNA-146 通过调控 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路促进 POI 模型卵巢颗粒细胞生长的机制研究\*

刘 英<sup>1</sup>, 何凤屏<sup>1,2 $\Delta$</sup> , 刘玉兰<sup>1</sup>, 范舒舒<sup>1</sup>, 刘彦慧<sup>2</sup>1. 广东省韶关市粤北人民医院体检中心, 广东韶关 523125; 2. 广东省东莞市  
妇幼保健院/东莞市生殖与遗传研究所, 广东东莞 512026

**摘要:**目的 探讨小鼠原发性卵巢功能不全(POI)模型的微小 RNA(miRNA)-146、Toll 样受体 4(TLR4)和核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)的水平及对卵巢颗粒细胞生长的影响。方法 取健康雌性 BALB/c 小鼠 40 只,随机分为 POI 组和对照组,每组 20 只。采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测血清 miRNA-146 水平;采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和白细胞介素-6(IL-6)表达水平;采用蛋白质印迹法检测小鼠卵巢组织 TLR4 和 NF- $\kappa$ B 蛋白水平。采用 miRNA-146 模拟物或抑制剂转染小鼠卵巢颗粒细胞,评估卵巢颗粒细胞增殖、生长活力和细胞凋亡率及 TLR4、NF- $\kappa$ B 通路蛋白的表达。采用 Spearman 相关分析 POI 模型 miRNA-146 水平与 TLR4 和 NF- $\kappa$ B 水平的相关性。结果 POI 组的 miRNA-146 水平显著低于对照组( $P < 0.05$ ), TNF- $\alpha$ 、IL-6、TLR4、NF- $\kappa$ B 水平高于对照组( $P < 0.05$ )。miRNA-146 模拟物在卵巢颗粒细胞中呈高表达水平,且呈浓度依赖趋势。miRNA-146 转染后,miRNA-146 模拟物组细胞凋亡率低于对照组,miRNA-146 抑制剂组细胞凋亡率高于对照组,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。Spearman 相关性分析结果显示,POI 小鼠的 miRNA-146 水平与 TLR4、NF- $\kappa$ B 水平呈负相关( $r = -0.725, -0.681, P < 0.05$ )。结论 上调 miRNA-146 水平具有促进卵巢颗粒细胞生长的作用,其机制可能与 miRNA-146 负性调控 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路和下调 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的表达相关,miRNA-146 有望作为评估卵泡质量的指标之一。

**关键词:**原发性卵巢功能不全; 微小 RNA-146; Toll 样受体 4; 核因子- $\kappa$ B

中图分类号:R711.75

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2023)15-2178-06

### Mechanistic study of miRNA-146 promoting the growth of ovarian granulosa cells in a POI model by regulating the TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway\*

LIU Ying<sup>1</sup>, HE Fengping<sup>1,2 $\Delta$</sup> , LIU Yulan<sup>1</sup>, FAN Shushu<sup>1</sup>, LIU Yanhui<sup>2</sup>1. Physical Examination Center, Yuebei People's Hospital of Shaoguan City, Shaoguan, Guangdong  
523123, China; 2. Dongguan Maternal and Child Health Hospital/Dongguan Institute of  
Reproduction and Genetics, Dongguan, Guangdong 512026, China

**Abstract: Objective** To investigate the expression levels of microRNA (miRNA)-146, Toll-like receptor 4 (TLR4), and nuclear transcription factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and their effects on ovarian granulosa cell growth in a mouse model of primary ovarian insufficiency (POI). **Methods** Forty healthy female BALB/c mice were taken and randomly divided into POI group and control group, with 20 mice in each group. The expression of miRNA-146 in serum was detected by qRT-PCR. The expression levels of inflammatory factors tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin -6 (IL-6) were detected by ELISA. The expression levels of TLR4 and NF- $\kappa$ B protein in mouse ovarian tissue were detected by Western blotting. Mouse ovarian granulosa cells were transfected with miRNA-146 mimics or inhibitors, and ovarian granulosa cells were evaluated for proliferation, growth viability, and apoptosis rates as well as expression of TLR4 and NF- $\kappa$ B pathway proteins. Correlation of miRNA-146 levels in POI model with TLR4 and NF- $\kappa$ B levels was analyzed by Spearman correlation analysis. **Results** Compared with the control group, the expression level of miRNA-146 in POI group decreased significantly ( $P < 0.05$ ), the expression levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, TLR4, NF- $\kappa$ B increased significantly ( $P < 0.05$ ). miRNA-146 mimics were expressed at high levels in ovarian granulosa cells in a concentration-dependent manner. After miRNA-146 transfection, the apoptosis rate of miRNA-146 mimics group was lower than that of the control group, and the apoptosis rate of miRNA-146 inhibitor group was higher than that of the control group, and the differences were all statistically significant ( $P < 0.01$ ). Spearman correlation analysis showed that miRNA-146 levels in POI mice were negatively correlated with TLR4 levels and NF- $\kappa$ B levels

\* 基金项目:广东省基础与应用研究基金区域重点项目(2020B1515120009)。

作者简介:刘英,女,副研究员,主要从事健康体检与健康教育方面的研究。  $\Delta$  通信作者, E-mail: watering@aliyun.com。

( $r = -0.725, -0.681, P < 0.05$ ). **Conclusion** Up-regulation of miRNA-146 expression level has the effect of promoting the growth of ovarian granulosa cells, and its mechanism may be related to the negative regulation of the TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway and down-regulation of the expression of TNF- $\alpha$  and IL-6 by miRNA-146, which is expected to be used as one of the indexes for assessing follicle quality.

**Key words:** premature ovarian insufficiency; microRNA-146; toll-like receptor 4; nuclear factor- $\kappa$ B

原发性卵巢功能不全(POI)通常是指女性 40 岁之前闭经,伴有高卵泡刺激素(FSH)和低雌激素水平,卵巢功能丧失导致闭经和性器官萎缩,抑制卵泡生长和发育<sup>[1]</sup>。目前尚无特异性标志物预测 POI 的发生,也无有效治疗措施改善卵巢功能,是导致女性不孕的重要原因<sup>[1-2]</sup>。POI 病因不清楚,其发病机制十分复杂,迄今为止尚不明确。文献显示,白细胞介素(IL)-6、肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)等炎症因子所介导的生理性炎症反应参与卵泡发育、成熟及排卵过程,炎症因子异常表达引发病理性炎症反应,可导致影响卵泡质量和排卵障碍及不孕等事件的发生<sup>[3]</sup>。卵巢中卵泡的正常发育、成熟及排出是女性孕育的重要条件,从始基卵泡发育至排卵前卵泡的过程中大量相关炎症因子活跃存在,但是任何影响卵母细胞质量及卵泡发育、成熟及排出过程的因素,均可能引起卵泡质量、排卵障碍进而导致女性不孕。据世界卫生组织(WHO)统计,20.0%~40.0%的不孕女性存在排卵障碍和卵泡发育不良,均与慢性炎症有关<sup>[4]</sup>,慢性炎症反应引起的卵泡发育不良和排卵障碍性等常见于 POI、多囊卵巢综合征(PCOS)等疾病,长期的慢性炎症还可引起炎症性衰老<sup>[5-6]</sup>,严重影响患者生育力。

微小 RNA(miRNA)是一类新的非编码 RNA,它通过与靶 mRNA 特异性结合,降解靶向 mRNA 或抑制其翻译过程,从而参与疾病的发生和发展,是重要的基因调控分子。既往研究表明,miRNAs 在卵巢和生殖细胞中均有表达<sup>[7]</sup>。miRNA-146 是第一个被发现对免疫系统有调节作用的 miRNA,miRNA-146 可通过负反馈调节核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)信号通路减轻或抑制炎症反应<sup>[8]</sup>。以往的研究证实 miRNA-146 通过调控 Toll 样受体 4(TLR4)/NF- $\kappa$ B 信号通路抑制脂多糖(LPS)诱导卵巢颗粒细胞凋亡<sup>[9]</sup>。因此,本研究拟探讨 miRNA-146 促进卵巢颗粒细胞增殖和生长的作用,分析其是否对 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路、TNF- $\alpha$  和 IL-6 炎症因子有调控作用,为 miRNA-146 在 POI 中的作用提供理论基础。

## 1 材料与方 法

**1.1 实验动物** 健康雌性 BALB/c 小鼠(8 周;体重 18~22 g)40 只,购自中山大学动物实验室。小鼠在温度为(22±2)℃、湿度为(50±5)%条件下,光照 12 h,黑暗 12 h,适应性喂养 1 周,然后将其随机分为 POI 组和对照组,每组 20 只。动物实验获得中山大学动物实验伦理委员会批准(编号:SYSU-IACUC-020-B1236)。

### 1.2 方 法

**1.2.1 小鼠 POI 模型的建立** 参考文献[10]通过注射透明带 3 肽(pZP3)建立 POI 小鼠模型,模型建立由中山大学动物室进行并提供 POI 模型鼠。

**1.2.2 miRNA-146 水平检测** 采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 miRNA-146 水平,采用 Trizol 法提取血清中总 RNA,采用 Roche LightCycler 480 II 型荧光定量 PCR 仪反转录为 cDNA,进行 PCR 扩增反应,内参基因 U6,严格按说明书进行操作。miRNA-146、内参 U6 引物和探针由广州市锐博生物有限公司提供。miRNA-146a 正向引物:5'-CACACAACGTCTCCGCTAT-3',反向引物:5'-GTGCGATCCAGTCGCG-3'; U6 正向引物:5'-CTCGCTTCGGCAGCACCA-3',U6 反向引物:5'-ACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。反应体系:SYBR Premix Ex Taq 10  $\mu$ L,正向引物 0.4  $\mu$ L,反向引物 0.4  $\mu$ L,ROX Reference Dye 0.4  $\mu$ L,DNA 模板 2.0  $\mu$ L,去离子水 6.8  $\mu$ L。反应条件:95℃ 10 s,循环 1 次;95℃ 5 s,60℃ 30 s,循环 40 次。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算目的基因的相对表达量。

**1.2.3 小鼠卵巢颗粒细胞培养** 每只小鼠腹腔注射孕马血清促性腺激素 8~10 U,48 h 后,颈椎脱臼处死,无菌条件下迅速取出双侧卵巢,用缓冲液 PBS 清洗 3 次,在体视显微镜下去除其周围脂肪和被膜,用 1 mL 注射器针头刺破卵泡使颗粒细胞和卵母细胞释放出来,加入 1 g/L 透明质酸酶消化使颗粒细胞与卵母细胞分离,用孔径为 0.074 mm 筛网过滤,1 000 r/min 离心 5 min。弃上清液,用 PBS(-)清洗 3 次,加入基础培养液(D/F12 培养基+100 U/mL 青霉素+100  $\mu$ g/mL 链霉素+0.5  $\mu$ g/mL 两性霉素 2B+体积分数 10% FBS)重悬。倒置相差显微镜观察结果表明,刚接种时颗粒细胞呈球形,10 h 后贴壁生长,培养 24 h 后,形态不规则,呈多角形或梭形。培养 5 d 时可铺满皿底,形成单层的颗粒细胞。

**1.2.4 双侧卵巢相对质量测定及组织形态学观察** 常规无菌方法留取卵巢,用冰冷生理盐水清洗,滤纸干燥,然后称重,计算小鼠卵巢相对质量[卵巢质量(mg)÷体质量(g)]。

卵巢称重后用 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋,将蜡块切成 4  $\mu$ m 厚的薄片,脱蜡,苏木精-伊红染色。每只切片至少选 3 个不同区域,高倍镜( $\times 200$ )下观察卵巢组织结构。

**1.2.5 卵巢颗粒细胞生长的活力测定** 采用 MTT 比色法测定颗粒细胞生长的活力。miRNA-146 转染颗粒细胞接种于密度为  $1 \times 10^3$  个细胞/孔的 6 孔板中,用磷酸盐缓冲液冲洗 2 次后,10  $\mu$ L MTT 溶液

稀释为 5 mg/mL,加到每一孔中。将培养皿在 37 °C 条件下培养 10 min,然后添加 150 μL 的二甲基亚砜,置摇床上低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 490 nm 处测量各孔的吸光值(A)。

**1.2.6 卵巢颗粒细胞增殖和凋亡测定** (1)颗粒细胞增殖:采用细胞克隆实验评价颗粒细胞的增殖能力。取对数生长期的细胞,用 0.25%的胰蛋白酶消化并吹打为单个细胞,离心后计数,取需要的细胞量(200~500 个/孔)重悬于对应的培养基,接种于细胞培养皿里。于 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 及饱和湿度的细胞培养箱内培养 2~3 周,在显微镜下观察细胞克隆的情况。(2)颗粒细胞凋亡:使用 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(北京 Biosea 生物技术有限公司)进行颗粒细胞凋亡检测,鉴定和定量颗粒凋亡细胞。将 miRNA 转染的细胞接种在密度为 1×10<sup>5</sup> 个细胞/孔的 6 孔板中,用冷磷酸盐缓冲液洗涤处理细胞 2 次,并将其重新悬浮在含有 10 μL 膜联蛋白 V 和 5 μL PI 的 200 μL 结合缓冲液中。将贴壁细胞和漂浮细胞结合,按照说明书进行操作,使用流式细胞仪(美国贝克曼库尔特)测量细胞百分比,以区分凋亡细胞(膜联蛋白 V 阳性和 PI 阴性)和坏死细胞(膜联蛋白 V 阴性和 PI 阳性)。

**1.2.7 miRNA-146 转染** VSMC 消化离心后以合适密度接种到培养板,24 h 后细胞融合到 60%~70% 时按照 Lipofec-tamine 2000 转染试剂说明书进行操作,分成 miRNA-146 抑制剂组、miRNA-146 模拟物组及对照组,分别转染 miRNA-146 抑制剂(50 mmol/L)、miRNA-146 模拟物(50 mmol/L),对照组加入同等剂量 Lipofec-tamine 2000 转染试剂及 PBS,5 h 后换成完全培养基,通过荧光显微镜观察转染效率。通过克隆实验检测 miR-146 模拟物、抑制物转染后颗粒细胞增殖情况,克隆形成率=(克隆数/接种细胞数)×100%。

**1.2.8 蛋白质印迹法及其他实验方法** 采用蛋白质印迹法检测小鼠卵巢组织中 TLR4 和 NF-κB 蛋白的水平,TLR4 和 NF-κB 抗体购自 Abcam 公司。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(广州市锐博生物有限公司)检测血清 IL-6 和 TNF-α 的水平。采用 Cobas 601 化学发光仪检测血清 FSH 和雌激素(E<sub>2</sub>)水平。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS21.0 统计软件进行数据分析。符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用 *t* 检验。计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验。采用 Spearman 相关分析 POI 模型 miRNA-146 水平与 TLR4 和 NF-κB 水平的相关性。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 两组小鼠性激素水平比较** POI 组的 FSH 水平高于对照组,而 E<sub>2</sub> 水平低于对照组,差异均有统计学意义(*P* < 0.05)。见表 1。

表 1 两组小鼠性激素水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	FSH(IU/L)	E <sub>2</sub> (pmol/L)
对照组	20	13.82±2.42	126.53±13.08
POI 组	20	57.51±4.17	82.25±11.26
<i>t</i>		-9.089	12.368
<i>P</i>		<0.001	<0.001

**2.2 两组小鼠血清 miRNA-146、IL-6、TNF-α 水平比较** POI 组血清 miRNA-146 水平低于对照组,IL-6、TNF-α 水平高于对照组,差异均有统计学意义(*P* < 0.05)。见表 2。

表 2 两组小鼠 miRNA-146、IL-6、TNF-α 水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	miRNA-146	IL-6 (ng/mL)	TNF-α (ng/mL)
对照组	20	3.67±1.28	18.76±4.31	23.71±5.79
POI 组	20	1.04±0.65	42.35±4.58	65.24±8.92
<i>t</i>		3.762	-6.034	-11.184
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

**2.3 miRNA-146 对卵巢颗粒细胞增殖、活力、生长、凋亡的影响** miRNA-146 模拟物增加颗粒细胞的克隆形成,miRNA-146 抑制剂抑制颗粒细胞的克隆形成,见图 1A。miRNA-146 模拟物在颗粒细胞中呈高水平表达,见图 1B;在不同水平(5,10,20,40 μg/mL) miRNA-146 的作用下,颗粒细胞生长活力均增强,且呈浓度依赖趋势,见图 1C。miRNA-146 转染后,miRNA-146 模拟物组细胞凋亡率低于对照组,miRNA-146 抑制剂组细胞凋亡率高于对照组,差异均有统计学意义(*P* < 0.01),见图 1D。

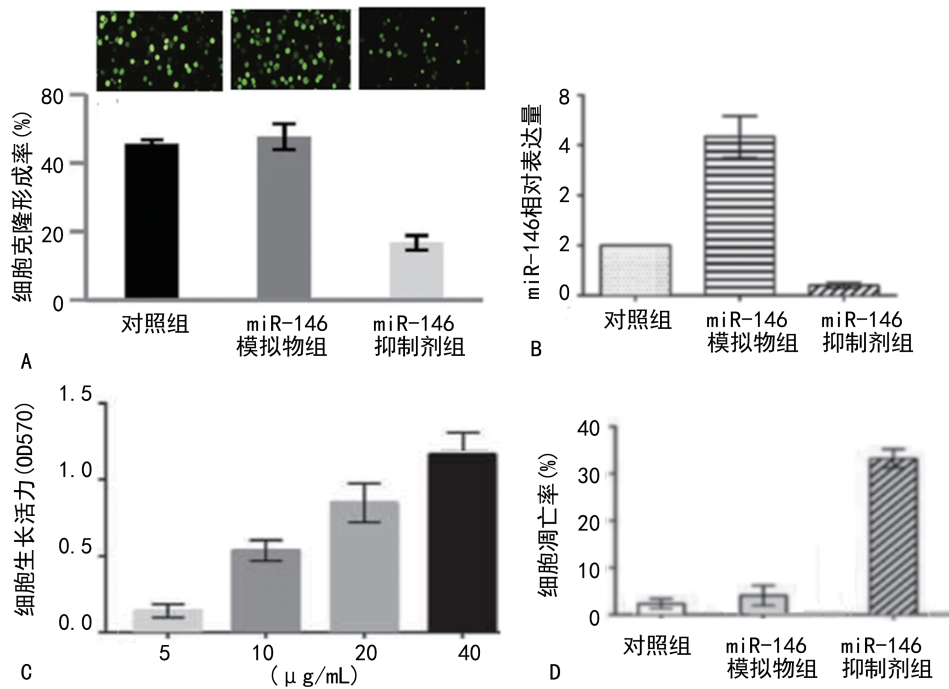
**2.4 两组小鼠卵巢组织中 TLR4、NF-κB 蛋白的水平比较** miRNA-146 模拟物组的 TLR4、NF-κB 水平低于对照组,而 miRNA-146 抑制剂组的 TLR4、NF-κB 水平高于对照组,差异均有统计学意义(*P* < 0.05)。

**2.5 相关性分析** Spearman 相关性分析结果显示,POI 小鼠的 miRNA-146 水平与 TLR4 水平和 NF-κB 水平呈负相关(*r* = -0.725、-0.681, *P* < 0.05)。

**2.6 两组小鼠 POI 模型的卵巢形态学和组织学变化** POI 组小鼠的卵巢最大径及质量明显小于对照组(*P* < 0.01)。见表 3。POI 组小鼠卵巢组织中可见早期卵泡闭锁及退化的卵母细胞和颗粒细胞,伴有大量间质和纤维组织增生,而对照组鼠卵巢组织学可见大量的成熟卵泡。见图 2。

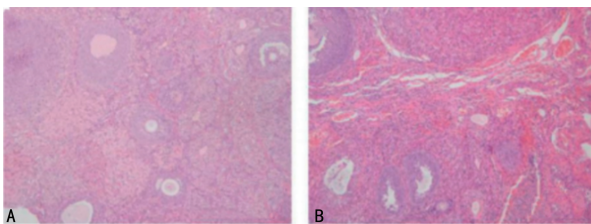
表 3 两组卵巢最大径及质量比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	卵巢最大径(cm)	质量(mg)
对照组	20	0.367±0.028	4.186±0.431
POI 组	20	0.210±0.016	1.913±0.258
<i>t</i>		3.762	6.034
<i>P</i>		<0.001	<0.001



注:A为miR-146模拟物、抑制剂转染后颗粒细胞增殖情况;B为miR-146模拟物、抑制物转染后miRNA-146表达水平;C为不同浓度miRNA-146对增加颗粒细胞生长活性的影响;D为各组颗粒细胞凋亡的情况。

图1 miRNA-146对卵巢颗粒细胞活力、生长、增殖、凋亡及TLR4、NF-κB蛋白表达的影响



注:A为对照组;B为POI组。

图2 两组小鼠卵巢组织HE染色结果(×200)

### 3 讨论

POI可能与炎症反应有显著相关性,而卵巢早衰(POF)为POI发展的终末阶段。慢性低度炎症为POI发生的重要原因之一,UC-MSC移植可通过旁分泌机制发挥抗凋亡和抗炎反应作用,抑制IL-6和IL-1β水平,减轻化疗诱导的POI或POF,改善卵巢功能,提示炎症反应的降低可能与POF的改善有相关性,同时也有研究通过临床患者试验证实炎症因子可能作为POI或POF患者的独立生物标志物<sup>[11]</sup>。根据当前的研究结果笔者推测POF与炎症反应有关。本研究结果显示POI组小鼠的炎症因子TNF-α和IL-6水平高于对照组,主要作用机制可能是miRNA-146负性调控TLR4/NF-κB信号通路,诱导TNF-α和IL-6高水平表达,导致卵巢发生炎症反应、缺氧,影响卵泡质量,最终造成不孕症的发生。POI是一个逐阶递进的过程,在POI的早期,如果调控miRNA-146、TLR4/NF-κB、TNF-α和IL-6水平,可以维持性激素水平在正常范围,不会影响生育能力,提示miRNA-146、TLR4、NF-κB水平与POI模型病情程度密切相关,可发挥临床预警作用。本研究结果显示,POI组血清miRNA-146、E<sub>2</sub>水平低于对照组,

而FSH水平高于对照组,可能是miRNA-146水平下调促进患者雌激素水平的异常,从而影响卵巢功能和卵泡质量<sup>[12]</sup>。一项在模型体内注射miRNA-146模拟物的研究显示,E<sub>2</sub>水平显著上调,FSH、LPS水平显著下调<sup>[13]</sup>。因此,miRNA-146有望作为评估卵泡质量的指标之一。

miRNAs与特异性的靶基因结合,在转录后水平引起靶mRNA剪切和翻译的抑制,参与调控细胞增殖、分化、凋亡、炎症反应、肿瘤的发生等<sup>[14]</sup>,miRNA-146家族成员被称为炎症诱导型miRNAs,参与Toll样受体(TLRs)信号的负反馈调节,诱导炎症反应,参与动脉粥样硬化、心血管疾病的发生和发展有密切关联<sup>[15]</sup>。TLRs是一种模式识别受体,参与慢性炎症、氧化应激、肿瘤微环境的形成。TLRs识别相应配体后,通过活化一系列信号转导分子激活NF-κB通路,介导炎症反应和氧化应激损伤等免疫反应<sup>[8-9]</sup>。TLRs存在于卵巢和生殖道中,它们在卵巢和卵泡排卵活动中发挥重要作用。NF-κB、有丝分裂原激活蛋白激酶(MAPK)和Janus激酶/信号转导与转录激活子(JAK/STAT)是炎症因子信号转导介导炎症反应的主要通路<sup>[16-17]</sup>,即使作用途径不同,但其中阻碍卵泡发育及排卵过程的相关炎症因子所起的作用是一样的。本研究结果显示,miRNA-146模拟物能够提高颗粒细胞增殖和生长的活力,并减少颗粒细胞的凋亡率,而且miRNA-146水平与颗粒细胞生长呈依赖关系,提示miRNA-146具有促进颗粒细胞增殖和生长的作用。其机制可能是miRNA-146通过调控免疫反应影响HPO轴的神经内分泌活动,诱导雌激素释放,从而促进颗粒细胞增殖和生长。有研究表明,炎

症因子 IL-6、免疫细胞与 NF- $\kappa$ B 等信号通路具有相互调控作用,通过影响垂体促性腺激素 FSH 受体、LH 受体表达及卵巢中雌、孕激素的水平以促进卵泡发育,而垂体 FSH 及 LH 的合成与分泌受到下丘脑分泌的促性腺激素释放激素(GnRH)的调节,诱导雌激素、孕激素释放,促进卵泡发育和成熟,但其确切机制尚未明确<sup>[16-18]</sup>。

本研究结果显示,POI 组 miRNA-146 水平低于对照组,miRNA-146 模拟物组的 TLR4、NF- $\kappa$ B 水平低于对照组,而 miRNA-146 抑制剂组的 TLR4、NF- $\kappa$ B 表达水平高于对照组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),可能是上调 miRNA-146 通过调控 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路影响 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的表达,提示炎症因子 TNF- $\alpha$  和 IL-6 参与卵巢的炎症反应,从而影响卵巢功能的障碍,是一种炎症性的卵巢功能衰竭。本研究结果显示,miRNA-146 抑制物诱导小鼠 TLR4、NF- $\kappa$ B 表达水平显著升高,而 miR-146 模拟物诱导 TLR4 和 NF- $\kappa$ B 表达水平显著降低,提示 TLR4 可能是 miRNA-146 的靶基因,并且通过 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路对 POI 发挥调控作用,其机制可能与下游的炎症因子释放有关。

本研究通过 HE 染色证实了在 POI 过程中,出现了卵巢体积和质量均减少,原始卵泡、初级卵泡、次级卵泡等显著降低,闭锁卵泡增加。miRNA-146 过表达通过抑制 Dab2ip/Ask1/p38MAPK 通路和  $\gamma$ H2A.X 磷酸化减轻小鼠参与卵细胞的增殖与凋亡过程<sup>[19]</sup>,同时有研究表明 POF 与颗粒细胞凋亡和卵泡早期闭锁密切相关,卵泡颗粒细胞发生凋亡是卵泡早期闭锁的主要原因,这是一个不可逆的逐步损耗过程,卵泡细胞缺乏再生能力,导致女性生殖能力的衰退,在早期闭锁卵泡的颗粒细胞中 Bax 促凋亡蛋白大量表达,而在正常或完全闭锁卵泡中几乎不表达;Bcl-2 基因缺失的小鼠模型中,卵泡数量下降,高表达的 Bcl-2 基因抑制小鼠卵泡颗粒细胞凋亡和卵泡早期闭锁,表明了卵泡发育过程中 Bcl-2 和 Bax 基因分别参与卵细胞增殖和凋亡的调控<sup>[20]</sup>,提示 miRNA-146 是卵巢正常功能的重要调控分子,发挥抑制 POI 的作用。

综上所述,本研究证明了 POI 与炎症反应有关,是一种由 miRNA 调控的卵巢慢性炎症性功能衰退,即 miRNA-146 可能过 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路抑制炎症反应,促进卵巢颗粒细胞增殖和生长,对 POI 的卵巢功能发挥保护作用。本实验通过相关性分析确定 miRNA-146 与 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路负相关,为 miRNA-146 在临床的应用提供理论基础。

## 参考文献

[1] PROSPER I, ABDELJABAR E A, SHEIKH U, et al. Intraovarian injection of autologous human mesenchymal stem cells increases estrogen production and reduces menopausal symptoms in women with premature ovarian failure: two case reports and a review of the literature[J].

J Med Case Rep, 2020, 14(1):108.

- [2] GIRI R, VINCENT A J. Prevalence and risk factors of premature ovarian insufficiency/early menopause[J]. Semin Reprod Med, 2020, 38(4/5):237-246
- [3] ZHU X, NIU Z, YE Y, et al. Endometrium cytokine profiles are altered following ovarian stimulation but almost not in subsequent hormone replacement cycles[J]. Cytokine, 2019, 114:6-10.
- [4] HOCQUETTE A, ZEITLIN J, HEUDE B, et al. World Health Organization fetal growth charts applied in a French birth cohort[J]. J Gynecol Obstet Hum Reprod, 2022, 51(3):102308.
- [5] LV S J, HOU S H, GAN L, et al. Establishment and mechanism study of a primary ovarian insufficiency mouse model using lipopolysaccharide [J]. Anal Cell Pathol (Amst), 2021, 2021:1781532.
- [6] SADEGHI H M, ADELI I, CALINA D, et al. Polycystic ovary syndrome; a comprehensive review of pathogenesis, management, and drug repurposing [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(2):583.
- [7] LI X, XIE J, WANG Q, et al. miR-21 and pellino-1 expression profiling in autoimmune premature ovarian insufficiency[J]. J Immunol Res, 2020, 2020:3582648.
- [8] YOU Z, YANG Z, CAO S, et al. The novel KLF4/BIG1 regulates LPS-mediated neuro-inflammation and migration in BV2 Cells via PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. Neuroscience, 2022, 488:102-111.
- [9] HE F P, LIU Y H, TANG L, et al. MicroRNA-146 attenuates lipopolysaccharide induced ovarian dysfunction by inhibiting the TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. Bioengineered, 2022, 13(5):1161-1162.
- [10] RHIM S H, MILLAR S E, ROBEY F, et al. Autoimmune disease of the ovary induced by a ZP3 peptide from the mouse zona pellucida[J]. J Clin Invest, 1992, 89(1):28-35.
- [11] FU B C, HULLAR M A J, RANDOLPH T W, et al. Associations of plasma trimethylamine N-oxide, choline, carnitine, and betaine with inflammatory and cardiometabolic risk biomarkers and the fecal microbiome in the Multiethnic Cohort Adiposity Phenotype Study[J]. Am J Clin Nutr, 2020, 111(6):1226-1234.
- [12] NAHAND J S, KARIMZADEH M R, NEZAMNIA M, et al. The role of miR-146a in viral infection [J]. IUBMB Life, 2020, 72(3):343-360.
- [13] LIN J, LI X L, SONG H, et al. A general description for Chinese medicine in treating premature ovarian failure [J]. Chin J Integr Med, 2017, 23(2):91-97.
- [14] LI H, WANG X, MU H, et al. miR-484 contributes to diminished ovarian reserve by regulating granulosa cell function via YAP1-mediated mitochondrial function and apoptosis [J]. Int J Biol Sci, 2022, 18(3):1008-1021.
- [15] CEKICI Y, KILIC S, OVAYOLU A, et al. Prediction of lipoprotein-associated phospholipase A2 and inflammatory markers in subclinical atherosclerosis in premature ovarian failure patients [J]. Acta Cardiol Sin, 2021, 37(1):30-37.

内、全关节内缝合成为目前临床使用较多的缝合方式,受到临床广泛认可,前者主要适用于前角或体部的半月板受损类型,选择套管针将缝合线从外向内穿过破裂的半月板组织,随后妥善固定在关节外;后者是选择特殊的半月板缝合器,例如“Fast-Fix”“Omnispan”或者 Fast-Fix 360、Rapidloc 等<sup>[18-19]</sup>。膝关节镜微创手术治疗方法已被广泛运用于临床,具备疗效显著、创伤小、恢复快等优势,且患者易于接受,同时清除半月板囊肿并修补损伤的半月板,以改善膝关节疼痛症状,为降低患者痛苦、提高生活质量提供保障,值得临床推广使用<sup>[20]</sup>。

综上所述,关节镜下囊肿减压半月板修补半月板囊肿的效果理想,可快速降低疼痛,改善患者关节活动度及膝关节功能,提升生活质量。

参考文献

[1] 王志学,姬振伟,吴鹏,等. 关节镜下 Outside-in 缝合技术治疗半月板囊肿的效果分析[J]. 实用骨科杂志,2022,28(6):553-555.

[2] 钱春红,沈海林,李振凯. 探讨膝关节囊性病变的磁共振影像(MRI)表现及其诊断价值[J]. 影像研究与医学应用,2019,3(18):54-55.

[3] 王志学,姬振伟,吴鹏,等. 关节镜下“隧道式”减压结合 Inside-out 缝合术治疗外侧半月板囊肿的疗效分析[J]. 实用骨科杂志,2021,27(12):1137-1140.

[4] NISHINO K, HASHIMOTO Y, NISHIDA Y, et al. Incidence and risk factors for meniscal cyst after meniscal repair[J]. Arthroscopy, 2019, 35(4):1222-1229.

[5] 郭旗,刘玉强,胡滨,等. 关节镜下微创治疗膝内侧半月板囊肿的临床疗效[J]. 实用骨科杂志,2020,26(5):471-474.

[6] 魏立伟,高燕,桑亮,等. 关节镜手术治疗半月板囊肿的处理策略[J]. 中国骨与关节损伤杂志,2021,36(4):407-409.

[7] 桑鹏,方琴,孙鹏鹏,等. 关节镜下囊肿减压切除联合双针缝合系统修复膝半月板周围囊肿[J]. 实用骨科杂志,2019,25(6):561-564.

[8] 孟庆阳,马勇,史尉利,等. 基于 MRI 的临床分型及手术入路选择治疗内侧半月板囊肿的效果[J]. 中国运动医学杂志,2021,40(10):767-771.

[9] 韩小华,吴斌洪,梁键锋,等. 膝关节半月板囊肿可行高频

超声引导微创治疗[J]. 分子影像学杂志,2019,42(4):449-452.

[10] KINOSHITA T, HASHIMOTO Y, NISHINO K, et al. Comparison of new and old all-inside suture devices in meniscal cyst formation rates after meniscal repair[J]. Int Orthop, 2022, 46(7):1563-1571.

[11] 庞聪聪,王振威,曹冉,等. 关节镜下半月板成形术对膝关节半月板损伤患者血清疼痛因子、一氧化氮、透明质酸及关节活动度的影响[J]. 临床误诊误治,2022,35(2):73-76.

[12] 姜于志,张岫,高想,等. 关节镜下两种松解技术治疗内侧半月板后角撕裂手术中的疗效对比研究[J]. 临床和实验医学杂志,2022,21(4):412-415.

[13] 鄢含坤,陈文革,夏正东,等. 膝关节外侧盘状半月板损伤关节镜手术中应用内外双针缝合术与全内缝合术的差异性探讨[J]. 临床和实验医学杂志,2022,21(16):1733-1736.

[14] 郑守超,石晶,王峰,等. 关节镜下半月板成形术治疗膝关节半月板损伤患者的效果观察及对 Lysholm 评分、关节生理功能的影响[J]. 解放军医药杂志,2021,33(3):82-86.

[15] 董鑫华,黎键,华慧. 关节镜下单针单线 outside-in-out 边缘稳定术治疗中青年外侧半月板边缘撕裂的疗效观察[J]. 浙江临床医学,2021,23(9):1272-1274.

[16] 房丽,张伟滨,何会超,等. 关节镜下缝合修复 3 度半月板损伤的效果及对膝关节本体感觉的影响[J]. 中国医药导报,2019,16(6):66-69.

[17] 王续鹏,李明,高士基,等. 膝关节内侧半月板前角罕见异常插入点的关节镜、组织学及影像学观察[J]. 中华骨科杂志,2022,42(5):290-296.

[18] GRASSI A, MACCHIAROLA L, LUCIDI G A, et al. Clinical outcomes, healing rate, and presence of peri-meniscal cysts after all-inside meniscal repair in combination with anterior cruciate ligament reconstruction: a prospective comparative study with magnetic resonance imaging assessment[J]. Int Orthop, 2022, 46(9):1999-2008.

[19] 孙敏,高志,陈鹏旭,等. 改良镜下技术治疗外侧半月板囊肿[J]. 中国矫形外科杂志,2022,30(10):925-928.

[20] 孟庆阳,马勇,史尉利,等. 关节镜下半月板囊肿切除联合缝合修补治疗外侧半月板多房囊肿的临床效果[J]. 中国运动医学杂志,2021,40(5):333-337.

(收稿日期:2023-04-24 修回日期:2023-05-15)

(上接第 2182 页)

[16] LI R, MA C, XIONG Y, et al. An antagonistic peptide of Gpr1 ameliorates LPS-induced depression through the hypothalamic-pituitary-ovarian axis [J]. Biomolecules, 2021, 11(6):857.

[17] GURINDER B S, YANG Z, KRISHNA M B, et al. High mobility group box 1 mediates TMAO-induced endothelial dysfunction[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(14):3570.

[18] 张文洁,宋佳怡,窦真,等. 炎症因子对卵泡发育的影响[J]. 中华生殖与避孕杂志,2021,41(4):377-381.

[19] LIU T, LIN J, CHEN C, et al. MicroRNA-146b-5p overexpression attenuates premature ovarian failure in mice by inhibiting the Dab2ip/Ask1/p38-Mapk pathway and  $\gamma$ H2A. X phosphorylation[J]. Cell Prolif, 2021, 54(1):e12954.

[20] LIU Y, ZUO H J, WANG Y, et al. Ethanol promotes apoptosis in rat ovarian granulosa cells via the Bcl-2 family dependent intrinsic apoptotic pathway[J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2018, 64(1):118-125.

(收稿日期:2022-12-28 修回日期:2023-05-12)