

分类号 _____

密级 _____

UDC _____

编号 _____

南方医科大学

博士学位论文

环状 RNA *circSLC8A1* 通过调控卵巢颗粒细胞功能参与

生化异常期早发性卵巢功能不全的机制研究

Circular RNA *circSLC8A1* participates in biochemical premature ovarian
insufficiency via regulating the function of ovarian granulosa cells

黎莹

导师姓名 _____ 陈士岭 教授

专业名称 _____ 妇产科学

培养类型 _____ 学术型

论文提交日期 _____ 2022年5月24日

南方医科大学 2019 级博士学位论文

环状 RNA *circSLC8A1* 通过调控卵巢颗粒细胞功能参与生化
异常期早发性卵巢功能不全的机制研究

**Circular RNA *circSLC8A1* participates in biochemical
premature ovarian insufficiency via regulating the function
of ovarian granulosa cells**

课题来源：南方医科大学临床研究项目（编号：LC2016ZD010）
南方医科大学南方医院临床研究专项（编号：2018CR016）
广东省基础与应用基础研究基金（2021A1515011061）

学 位 申 请 人	黎 莹
导 师 姓 名	陈士岭 教授
专 业 名 称	妇产科学
培 养 类 型	学术型
培 养 层 次	博士研究生
所 在 学 院	第一临床医学院

答 辩 委 员 会 主 席	罗深秋 教授
答 辩 委 员 会 成 员	方丛 教授
	梁晓燕 教授
	张琳 教授
	张清学 教授

2022 年 5 月 24 日 广州

环状 RNA *circSLC8A1* 通过调控卵巢颗粒细胞功能参与生化异常期早发性卵巢功能不全的机制研究

摘 要

研究目的

早发性卵巢功能不全 (Premature Ovarian Insufficiency, POI) 是女性较为常见的生殖内分泌疾病之一, 是指女性在 40 岁前卵巢生殖与内分泌功能均严重衰退甚至丧失的临床综合征, 其中特发性或不明原因性 POI 的发病机制尚未完全明确。环状 RNA (Circular RNA, circRNA) 是近年来非编码 RNA 的研究热点, 大量研究表明 circRNA 在多种人类重大疾病中发挥了重要作用, 但其在 POI 发病中的作用鲜有文献报道。我们前期获取了生化异常期 POI (Biochemical POI, bPOI) 患者和对照组患者卵巢颗粒细胞的 circRNA 差异表达谱, 通过筛选和验证发现 *circSLC8A1* (*circ_0000994*) 在 bPOI 患者卵巢颗粒细胞中表达显著下调, 但其在卵巢功能调控及 bPOI 发病中的作用尚不清楚。因此, 本研究旨在探索 *circSLC8A1* 对卵巢颗粒细胞功能的影响及其作为 bPOI 诊断生物标志物的价值, 揭示 *circSLC8A1* 参与调控 bPOI 发生发展的分子作用机制, 为 bPOI 的发病机制研究及早期诊治提供新的思路。

研究方法

运用实时定量聚合酶链式反应 (Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction, qRT-PCR) 法检测 52 例 bPOI 和 52 例对照组患者卵巢颗粒细胞中

circSLC8A1 的表达水平，并与患者临床数据之间进行统计学分析。通过琼脂糖电泳凝胶、Rnase R 处理和 Sanger 测序进行 *circSLC8A1* 的成环鉴定。采用细胞核质 RNA 分离和 RNA 荧光原位杂交技术检测 *circSLC8A1* 在细胞中的定位。利用 siRNA 干扰 *circSLC8A1* 表达，并在 KGN 和人黄素化颗粒细胞（Human Luteinized Granulosa Cell, hLGC）中进行体外实验研究：包括运用 CCK-8 和 EdU 实验检测 *circSLC8A1* 对颗粒细胞增殖的影响；利用流式细胞技术及 Western blot 实验探索 *circSLC8A1* 对颗粒细胞凋亡的影响；利用 qRT-PCR、Western blot 和电化学发光法检测沉默 *circSLC8A1* 后对颗粒细胞雌二醇（Estradiol, E₂）合成的影响及其作用机制；利用透射电镜、Western blot、RFP-GFP-LC3 腺病毒探索 *circSLC8A1* 对颗粒细胞自噬的影响及其相关调控信号通路。

研究结果

（1）qRT-PCR 实验证实 *circSLC8A1* 在 bPOI 患者颗粒细胞中表达下调，其表达水平与患者血清基础 FSH、窦状卵泡数、抗苗勒氏管激素和获卵数等临床参数密切相关；受试者工作特征曲线分析结果提示 *circSLC8A1* 具有诊断 bPOI 患者的潜力；

（2）*circSLC8A1* 是一个具有闭合环状结构的 circRNA；*circSLC8A1* 在颗粒细胞的细胞核和细胞质中均有分布，但主要定位于细胞质中，且 siRNA 可以有效干扰 *circSLC8A1* 的表达；

（3）干扰 KGN 和 hLGC 中 *circSLC8A1* 表达促进了颗粒细胞 Bax/Bak/Caspase-9 依赖的凋亡途径并抑制其增殖；

（4）干扰 KGN 细胞中 *circSLC8A1* 表达抑制了颗粒细胞的 E₂ 合成，这可能是通过芳香化酶基因 *CYP19A1* 和 *FSHR* 基因以及 FSH/cAMP/PKA 信号通路调控的；

（5）干扰 KGN 和 hLGC 中 *circSLC8A1* 表达能明显促进细胞自噬，这可能是通过影响 *P21* 表达和 JNK/c-Jun/P21 信号通路来调控的。

研究结论

circSLC8A1 在 bPOI 患者卵巢颗粒细胞中表达明显下调, *circSLC8A1* 可能通过调控颗粒细胞增殖、凋亡、自噬和 E₂ 合成来影响卵巢内卵泡的生长发育以及闭锁, 参与 bPOI 及其相关不孕症的发生。

关键词 生化异常期早发性卵巢功能不全 颗粒细胞 非编码RNA *circSLC8A1* 自噬

Circular RNA *circSLC8A1* participates in biochemical premature ovarian insufficiency by regulating the function of ovarian granulosa cells

ABSTRACT

Purpose

Premature Ovarian Insufficiency (POI) is one of the common reproductive endocrine diseases in women, which refers to the clinical syndrome in which the reproductive and endocrine functions of the ovary are seriously declined or even lost before the age of 40, and the pathogenesis of idiopathic or unexplained POI has not been fully clarified. Circular RNA (circRNA) is a research hotspot of noncoding RNA in recent years. Numerous researches have shown that circRNAs play a vital role in a variety of major human diseases, but its role in the pathogenesis of POI is rarely reported. We obtained the differential expression profile of circRNAs in the ovarian granulosa cells of patients with biochemical POI (bPOI) and control group. Through screening and verification, we found that *circSLC8A1* (*circ_0000994*) was significantly down-regulated in the ovarian granulosa cells of patients with bPOI. However, its role in the regulation of ovarian function and the pathogenesis of bPOI remains unclear. Therefore, this study aims to explore the effect of *circSLC8A1* on ovarian granulosa cell function and its value as a diagnostic biomarker for bPOI, to reveal the molecular mechanism of *circSLC8A1* participating in the regulation of the occurrence and development of bPOI, and to provide new insights into the pathogenesis study and the early diagnosis and treatment of bPOI.

Methods

We performed qRT-PCR to determine the levels of *circSLC8A1* in fifty-two bPOI patients and fifty-two controls, then were statistically analyzed with clinical characteristics of the patients. The circular form of *circSLC8A1* was identified by agarose gel electrophoresis, Rnase R and Sanger sequencing. The localization of *circSLC8A1* in cells was detected by cytoplasmic and nuclear extracts and RNA fluorescence in situ hybridization. siRNA was used to interfere the expression of *circSLC8A1*, and *in vitro* experiments including CCK-8 and EdU experiments were carried out in KGN cells and human luteinized granulosa cell (hLGC) to detect the effect of *circSLC8A1* on the proliferation of granulosa cells. Flow Cytometry and Western blot were used to explore the effects of *circSLC8A1* on granulosa cell apoptosis. qRT-PCR, Western blot and electrochemiluminescence immunoassay were used to detect the effects and its mechanism of *circSLC8A1* silencing on the estradiol (E₂) biosynthesis of granulosa cells. Transmission electron microscope, Western blot and RFP-GFP-LC3 adenovirus were used to explore the effects and its mechanism of *circSLC8A1* on granulosa cell autophagy.

Results

(1) The results of qRT-PCR confirmed that the expression of *circSLC8A1* in granulosa cells of patients with bPOI was significantly decreased, and its expression levels were related to patient's serum basal FSH, antral follicle count and the number of oocytes retrieved. The results of receiver operating characteristic curve indicated that *circSLC8A1* has potential diagnostic value in bPOI. (2) *circSLC8A1* is a circRNA with a closed ring structure. *circSLC8A1* is distributed in both the nucleus and the cytoplasm of granulosa cells, but is mainly located in the cytoplasm, and siRNA can effectively interfere with the expression of *circSLC8A1*. (3) Silencing of *circSLC8A1* in KGN and hLGC promoted the Bax/Bak/Caspase-9-dependent apoptosis of granulosa cells and inhibited their proliferation. (4) Silencing of *circSLC8A1* expression in KGN cells inhibited the E₂ biosynthesis of granulosa cells, which may be regulated by the aromatase gene *CYP19A1*, *FSHR* gene and the FSH/cAMP/PKA

signaling pathway. (5) Silencing of *circSLC8A1* in KGN and hLGC could obviously promote cell autophagy, which may be regulated by affecting *P21* expression and JNK/ c-Jun /P21 signaling pathway.

Conclusions

The expression levels of *circSLC8A1* were significantly decreased in the granulosa cells of patients with bPOI. *circSLC8A1* may affect the growth and development as well as the atresia of ovarian follicles by regulating granulosa cell proliferation, apoptosis, autophagy and E₂ biosynthesis, involving in the pathogenesis of bPOI and its associated infertility.

KEYWORDS Biochemical Premature Ovarian Insufficiency; Granulosa cell; Noncoding RNA; CircSLC8A1; Autophagy

目 录

前言.....	1
1. 早发性卵巢功能不全的临床表现与治疗现状	3
2. 早发性卵巢功能不全的病因学研	4
3. 环状 RNA 参与早发性卵巢功能不全发病机理的研究.....	5
4. circSLC8A1 参与早发性卵巢功能不全的研究进展	7
5. circSLC8A1 通过调控卵巢颗粒细胞功能参与早发性卵巢功能不全发病的研究进展	8
第一章 环状 RNA circSLC8A1 在生化异常期早发性卵巢功能不全患者卵巢颗粒细胞中的表达及临床意义	9
1 前言.....	9
2 实验材料.....	10
3 研究方法.....	12
4 实验结果.....	17
5 讨论.....	20
6 小结.....	22
第二章 环状 RNA circSLC8A1 调控卵巢颗粒细胞的增殖、凋亡和雌二醇合成的作用机制	23
1 前言.....	23
2 实验材料.....	24
3 研究方法.....	29
4 实验结果.....	49
5 讨论.....	63
6 小结.....	67
第三章 环状 RNA circSLC8A1 对卵巢颗粒细胞自噬的影响及其作用机制	68
1 前言.....	68
2 实验材料.....	69
3 研究方法.....	73
4 实验结果.....	75
5 讨论.....	87
6 小结.....	90
全文小结.....	91
参考文献.....	93
中英文对照缩略表	101

前 言

早发性卵巢功能不全（Premature Ovarian Insufficiency, POI）是女性较为常见的生殖内分泌疾病之一，过去也被称为卵巢早衰（Premature Ovarian Failure, POF），是指妇女在 40 岁前卵巢功能出现衰退甚至丧失的临床综合征，其主要特征为月经紊乱，同时伴有促性腺激素的升高（主要为卵泡刺激素 [Follicle-Stimulating Hormone, FSH] 的升高）和雌激素的降低。从长期来看，POI 与心血管疾病和骨质疏松的风险增加有关，并伴有一定程度的认知功能减退^[1]。POI 的最新诊断标准为：月经稀发或闭经 >4 个月，连续 2 次测 FSH >25 IU/L，且两次 FSH 测定间隔 >4 周^[2]。POI 患病率约为 1-3%，并随着年龄的增长有增加的趋势。由于卵巢功能下降被认为是一个连续的、波动的过程，因此有国外研究学者主张以基础 FSH 水平、生育能力以及月经情况为评估指标，将 POI 患者的卵巢功能衰退进展划分为正常、隐匿期、生化异常期以及临床异常期 4 个阶段^[3]。隐匿期 POI 患者的临床特征为：患者月经规律，并且检测基础 FSH 水平在正常范围内，但患者的生育能力开始出现下降。生化异常期 POI（Biochemical POI, bPOI）患者的临床特征为：患者月经保持规律，但检测基础 FSH 水平开始上升，并且患者的生育能力明显下降。临床异常期 POI 患者的临床特征为：患者月经开始出现紊乱，甚至出现闭经，并且检测基础 FSH 水平进一步上升（>40 mIU/mL），患者的生育能力严重下降，类似于 POF 的表现。多数 POI 患者来医院就诊时，已经发展到临床异常期：FSH >40 IU/L，甚至出现闭经，错过了最佳助孕时间。因此，POI 的早期诊断、对患者生育力的早期预警是目前生殖医学领域的研究热点和难点。

POI 病因复杂，国内研究团队对 955 例 POI 患者进行了回顾性研究，发现遗传因素占 POI 病因的 13.15%，免疫因素占 POI 病因的 12.04%，而医源性因素占 POI 病因的 7.29%，但仍有约 68% 的 POI 患者病因尚不明确^[4]。目前 POI 的病因学研究主要围绕着遗传学因素展开，已发现多个与 POI 发病相关的候选

基因，包括 *BMP15*、*PGRMC1*、*FMRI*、*LHR*、*AMH* 和 FSH 受体（FSH receptor, *FSHR*）基因等^[5-7]，这些基因涉及性腺发育、减数分裂、DNA 修复、卵泡生成、类固醇生成、细胞凋亡和线粒体功能等。迄今为止，寻找 POI 候选基因主要集中在编码基因变异上，然而，人类基因组中只有约 1.5%的基因组是编码蛋白质的，其余大部分以非编码 RNA（Noncoding RNA, ncRNA）形式存在^[8]，因此 ncRNA 可能是研究 POI 发病机制的巨大候选基因库。环状 RNA（Circular RNA, circRNA）是近年来 ncRNA 的研究热点，大量研究表明 circRNA 在多种人类重大疾病中发挥了重要作用，但其在 POI 发病机制中的作用鲜有文献报道。

我们前期获取了 bPOI 患者和对照组患者卵巢颗粒细胞的 circRNA 差异表达谱，对芯片数据进行分析，发现在 bPOI 组有 133 条显著上调的 circRNA 和 424 条显著下调的 circRNA（Fold Change>2.0 且 P<0.05）^[9]。虽然通过 circRNA 芯片检测，我们在 bPOI 中发现了大量差异表达的 circRNA，但大部分 circRNA 在颗粒细胞中表达量较低。circRNA 相对较低的序列保守性和表达水平可能会导致不显著、甚至不明显的影响。因此，为了更大程度上筛选出有意义的 circRNA，我们对差异表达 circRNA 数量更多的下调 circRNA 进行保守性和表达量分析，最终筛选了在卵巢颗粒细胞中表达水平较高、保守性较好的 *circSLC8A1*（*circ_0000994*）进行更深入的研究。通过扩大样本实时定量聚合酶链式反应（Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction, qRT-PCR）实验也进一步证实 *circSLC8A1* 在 bPOI 患者卵巢颗粒细胞中表达明显下调，但其在卵巢功能调控及 bPOI 发病机制中的作用尚不清楚。因此，本研究旨在探索 *circSLC8A1* 对卵巢颗粒细胞功能的影响及其作为 bPOI 诊断性生物标志物的价值，揭示 *circSLC8A1* 参与调控 bPOI 发生发展的作用机制，为 POI 的发病机制研究及早期诊治提供新的研究思路。

1. 早发性卵巢功能不全的临床表现与治疗现状

女性确诊 POI 后通常会引起一系列的心理和生殖疾病，在女性一生中会造成月经紊乱、不孕、以及主要由雌激素缺乏引起的各种健康问题。POI 患者的典型临床表现为月经紊乱、生育能力降低或不孕、低雌激素水平的表现或者伴随着其他症状。根据有无月经来潮可将 POI 划分为原发性 POI 和继发性 POI。原发性 POI 表现为原发性闭经，而继发性 POI 会随着卵巢功能的下降，相继出现月经周期紊乱、月经量减少、月经稀发、闭经等。POI 也是导致许多女性不孕的重要原因，约有 50% 的 POI 患者的卵巢功能变化无常且不可预测。有 5%-10% 的女性患者在被确诊为 POI 后，仍能够自然妊娠^[10]，但这部分患者的自然流产率以及胎儿染色体畸变风险均有升高。原发性 POI 伴随的低雌激素水平通常表现为女性的第二性征不发育或发育不良，例如特纳氏综合症，其由于性染色体的异常，导致卵巢不发育，引起女性激素的缺乏，表现为生殖器与第二性征不发育、原发性闭经、生长发育迟缓等^[11]。继发性 POI 伴随的低雌激素水平往往表现为潮热出汗、失眠多梦、心律紊乱、性欲减退、骨质疏松、情绪和认知功能异常等症状。不同病因的 POI 可导致不同受累器官的病变，出现相应的伴随症状，例如智力障碍、心血管系统发育缺陷、复发性流产、肾上腺和甲状腺功能降低等。此外，患者在确诊 POI 后，心理负担较重，更容易出现焦虑、抑郁等心理问题。因此，POI 严重威胁着女性的身心健康和远期生活质量，会对患者家庭和谐以及社会稳定造成影响。

POI 的治疗方案应根据患者年龄、有无生育需求、临床症状以及辅助检查结果等进行个体化制定。在临床上，POI 患者的低雌激素水平常用激素补充治疗（Hormone Replacement Therapy, HRT）改善，但对于患者的生育问题，目前尚没有恢复 POI 卵巢功能和提高 POI 受孕率的有效治疗措施。在临床上，POI 患者即使在应用了克罗米芬、口服避孕药、脱氢表雄酮、促性腺激素释放激素激动剂等药物后，其助孕结局仍然较差^[12]。随着促排卵技术的广泛应用，为了诱发 POI 患者的卵泡发育与排卵，许多临床医师也尝试了多种促排卵方案，但

尚未有确切的证据证明其疗效。赠卵体外受精-胚胎移植(In vitro Fertilization-Embryo Transfer, IVF-ET)被认为是目前 POI 患者实现生育的最有效手段^[2, 13], 但由于国内赠卵法规非常严格, 目前尚难以实施。因此, 研究 POI 的发病机制以及寻找 POI 早期诊断生物标志物和新的治疗靶点显得尤为重要。

2. 早发性卵巢功能不全的病因学研究

POI 的病因是高度异质性的, 主要包括遗传因素、免疫因素、医源性因素以及环境因素等, 但仍有 60-70% 的 POI 患者病因未明^[4], 被称为特发性 POI。POI 是女性不孕的主要原因之一, 导致不孕的主要原因是 POI 患者的卵巢储备功能下降。

不同病因的 POI 患者通常表现出不同的疾病表型。与其他病因相比, 遗传因素导致的 POI 患者的疾病表型最为严重^[4]。遗传因素占 POI 病因的 20%-25%, 主要包括基因变异和染色体异常等^[14]。有研究团队对 531 例中国 POF 患者进行了核型分析及表型相关性分析, 发现 POF 患者中有 64 例(12.1%)存在染色体异常。X 染色体异常被认为是 POI 中最常见的染色体异常, 而常染色体异常只占少部分。在 8%-10% 的 POI 患者中会出现 X 染色体畸变, 包括 X 单体、细胞遗传学上可见的缺失和重复、以及平衡和不平衡的 X 常染色体重排等^[15]。X 单体(45, X)如 Turner 综合征的特征是在女性胎儿发育期间减数分裂前期的粗线期时卵母细胞丢失, 导致出生时生殖腺发育不良^[16]。两条结构正常的 X 染色体的存在对减数分裂至关重要, 减数分裂紊乱会导致生殖细胞加速衰竭, 周围的体细胞包括颗粒细胞发生凋亡, 最严重的情况下会导致卵巢发育不良^[16, 17]。染色体结构异常, 如 X 染色体/常染色体易位、大 X 染色体短臂和长臂同时缺失等与 POI 和不孕症的发病有关^[18, 19]。尽管在 X 染色体上, 只有少数基因与卵巢发育有关, 包括 BMP15、FMR1 和 PGRMC1 等, X 染色体异常在 POI 发病机制中仍然发挥着十分重要的作用^[18-20]。

此外, 一些单基因变异被发现与 POI 的发病有关, 但其临床意义尚不清楚。目前 POI 的遗传基因研究大多数是针对已知在卵泡生长发育中起重要作用

的基因，例如 *NR5A1*、*NOBOX*、*FIGLA* 和 *FOXL2* 等；调控卵泡发生生长因子，例如抑制素 A、*GDF9* 和 *BMP15* 等；或在卵巢类固醇生成中起重要作用的基因，例如 *FSHR*、*LHR*、*STAR*、*CYP17A1* 和 *CYP19A1* 等^[21]。许多基因被发现以单基因的方式引起 POI，但生殖表型也可能是由许多基因以多基因的方式相互作用的结果，这些基因影响着卵巢生长发育的各个阶段，如性腺发育、减数分裂、DNA 修复、卵泡生成、类固醇生成、细胞凋亡和线粒体功能等^[22, 23]。

3. 环状 RNA 参与早发性卵巢功能不全发病机理的研究

目前 POI 的具体发病机制仍未完全明确，约 60%-70% 的 POI 病例是特发性的，因此一些尚未确定的基因，可能有助于阐明这些病例的病因。迄今为止，寻找 POI 候选基因主要集中在编码基因变异上，然而，人类基因组中只有约 1.5% 的基因组是编码蛋白质的，其余大部分以 ncRNA 的形式存在^[8]，因此 ncRNA 可能是研究 POI 发病机制的巨大候选基因库。

ncRNA 主要包括长链非编码 RNA (Long noncoding RNA, lncRNA)、微小 RNA (microRNA, miRNA)、circRNA、小干扰 RNA 和 piRNA 等。过去几年，许多研究表明 miRNA 和 lncRNA 在 POI 发生发展中发挥着重要作用^[24, 25]。近年来，circRNA 在 ncRNA 研究中越来越受到关注。大量研究表明 circRNA 在多种人类重大疾病中发挥了重要作用，但其在 POI 发病机制中的作用鲜有文献报道。大多数 circRNA (约 84%) 来源于蛋白质编码基因，约 85% 与已知编码和非编码基因的外显子对齐，10% 与反义对齐，而其余 5% 与非翻译区域、内含子或未注释基因位点对齐^[26]，它们的生物发生是由特定的基因组特征、反向剪接和 RNA 结合蛋白 (RNA binding proteins, RBP) 的额外微调驱动的。circRNA 的功能表现在分子水平、细胞水平和机体水平，既可以干预正常的生理过程，也可以干预病理过程。circRNA 能够通过调控转录/剪接、作为 miRNA 分子海绵/蛋白海绵、以及作为组件翻译/组装的支架等分子机制来调节遗传信息的表达^[27]。大部分 circRNA 在细胞浆中富集，并且大多数 circRNA 的表达水平较低，其丰度约为相应线性 RNA 的 5%-10%^[28]。然而，一些 circRNA

由于其高稳定性而在细胞中积累，能够超过线性 RNA 表达水平的 10 倍左右^[29, 30]。高表达的 circRNA 具有细胞和基因特异性，它们的水平与相应的线性 RNA 水平并不相关^[28]。circRNA 是一类丰富而保守的 ncRNA，广泛存在于生物体内，因此具有结构稳定性、序列保守性、细胞类型特异性和组织特异性等特点。circRNA 的高度跨物种保守性和显著的稳定性表明，这些 circRNA 在生物体内具有重要的功能。

circRNA 具有闭合环状结构，对核酸酶具有高耐受性，因此比线性 RNA 更为稳定。不断积累的数据表明，circRNA 具有潜在的临床相关性和实用性，特别是 circRNA 具有作为疾病诊断、预后和预测生物标志物的强大潜力，这一点可从 circRNA 在血浆、唾液和尿液等液体活检样本中均可检测出而得到体现。一项妊娠早期孕妇血小板的 circRNA 测序结果显示 circRNA 核受体相互作用蛋白 1 覆盖 5'-非翻译区外显子 2 和 3 是妊娠特异性的，与非妊娠对照组相比，在妊娠早期孕妇血小板中上调，提示妊娠早期孕妇血小板的 circRNA 测序可以鉴定出新的妊娠特异性 RNA 生物标志物^[31]。另一项在大动脉粥样硬化卒中患者差异表达 circRNA 的转录组范围调查结果显示，*hsa_circ_0001599* 可作为大动脉粥样硬化卒中的新型生物标志物^[32]。*hsa_circ_102958* 被报道可能是一种新的、稳定的胃癌诊断生物标志物^[33]。有研究检测了 32 例活动性肺结核患者和 31 例健康志愿者外周血中 *hsa_circ_0001380* 的表达水平，发现 AUC 达到 0.9502，提示 *hsa_circ_0001380* 具有作为活动性肺结核诊断性生物标志物的潜力^[34]。*EML4-ALK* 融合基因产生的 circRNA *F-circEA* 可作为非小细胞肺癌的新型液体活检生物标志物^[35]。这些研究表明 circRNA 具有作为疾病诊断性生物标志物的巨大潜力。

目前 circRNA 在 POI 中的作用机制尚未完全明确。有研究报道 bPOI 患者卵巢颗粒细胞中上调的 *circTRIM24* 和 *circEMSY* 可通过影响颗粒细胞的激素合成、DNA 损伤修复及凋亡等功能，参与 POI 的发生发展过程^[36]。另一研究报道了 POI 患者及正常对照组血浆中 circRNA 的差异表达谱，发现有 12 条显著上调的 circRNA 和 23 条显著下调的 circRNA，但具体的作用机制尚不清楚^[37]。

我们前期利用 circRNA 芯片测序获取了 bPOI 患者和对照组患者卵巢颗粒细胞的 circRNA 差异表达谱，对芯片数据进行分析发现有 133 条显著上调的 circRNA 和 424 条显著下调的 circRNA^[9]。目前，在 POI 中只有极少数的 circRNA 被详细研究，仍然有许多潜在的候选基因有待进一步探索。

4. *circSLC8A1* 参与早发性卵巢功能不全的研究进展

虽然我们前期在 bPOI 患者卵巢颗粒细胞中发现了大量差异表达的 circRNA，但大部分 circRNA 在颗粒细胞中表达量较低。circRNA 相对较低的序列保守性和表达水平可能会导致不显著、甚至不明显的影响。因此，为了更大程度上筛选出有意义的 circRNA，我们对差异表达 circRNA 数量更多的下调 circRNA 进行保守性和表达量分析，最终筛选了在卵巢颗粒细胞中表达水平较高、保守性较好的 *circSLC8A1* (*circ_0000994*) 进行更深入的研究。

circSLC8A1 起源于 *SLC8A1* 基因，也被称为 *circNCX1*，由外显子 1 的头尾拼接组成，长度为 1832bp。*SLC8A1* 基因广泛表达于心脏、卵巢和子宫内膜等组织^[38]。有研究学者利用 PhyloP 对 *SLC8A1* 基因座进行多重比对，发现该环状区域在哺乳动物中具有显著的保守性^[39]，表明 *circSLC8A1* 序列具有较高的保守性。*circSLC8A1* 可以通过靶向 *miR-106b-5p/FOXJ3* 轴抑制非小细胞肺癌细胞的增殖和侵袭^[40]。*circSLC8A1* 可能通过靶向 *miR-21* 调控细胞增殖、血管生成、细胞迁移、上皮向间质转化、MAPK 信号通路和趋化因子信号通路参与前列腺癌的发病^[41]。*circSLC8A1* 可以通过吸附 *miR-671* 调控 PTEN/PI3K/Akt 信号通路从而抑制乳腺肿瘤生长^[42]。靶向心肌细胞中高度丰富的 *circSLC8A1* 可以减轻压力过载诱导的心肌肥大^[43]，并能打破心肌肥厚的恶性循环^[44]。*circSLC8A1* 可通过靶向 *miR-133a-3p* 介导缺血性心肌损伤^[39]，并可能是心肌缺血-再灌注损伤潜在的新型生物标志物和危险因素预测因子^[45]。*circSLC8A1* 可作为 *miR-130b/miR-494* 的分子海绵调控 *PTEN* 表达从而抑制膀胱癌进展^[46]。有研究发现 *circSLC8A1* 与氧化应激相关的帕金森病有关^[47]。但 *circSLC8A1* 在调控卵巢功能和 POI 发病中的作用未有研究报道，仍有待进一步的研究。

5. *circSLC8A1* 通过调控卵巢颗粒细胞功能参与早发性卵巢功能不全发病的研究进展

原始卵泡池生成不足或卵泡耗竭加速被认为是 POI 的主要发病机制^[48]。颗粒细胞是卵巢的主要功能细胞，其功能异常会对卵泡的生长发育、闭锁、排卵、黄体形成以及激素合成等卵巢功能活动造成影响。颗粒细胞的迅速生长和增殖被认为是卵泡发育的显著标志之一，颗粒细胞与卵泡膜细胞共同协作完成卵巢类固醇激素的合成和分泌，是维持卵母细胞生长和成熟所必需的。

近年来许多研究表明颗粒细胞的功能异常，包括增殖异常、凋亡异常、自噬异常以及类固醇激素合成异常等，均与 POI 的发生发展密切相关。有研究发现高甲基化诱导的 lncRNA-*Pvt1* 表达下调可通过增加 *Foxo3a* 表达而促进颗粒细胞凋亡，而 *Pvt1* 过表达载体可改善 POI 小鼠的卵巢功能^[49]。在小鼠 POI 模型中，人骨髓间充质干细胞分泌体可促进 POI 小鼠颗粒细胞的增殖和类固醇激素的生成，从而改善 POI 小鼠的卵巢功能^[50]。T 缺陷介导的 T1 反应可通过调控颗粒细胞凋亡和类固醇激素生成参与 POI 的发病^[51]。我们的前期研究发现高级氧化蛋白产物可通过 ROS-JNK/p38 MAPK-P21 信号通路抑制颗粒细胞增殖和细胞周期进展，从而参与 POI 的发病^[52]。在顺铂诱导的 POI 小鼠模型中，顺铂诱导的内质网应激可促进颗粒细胞的自噬和凋亡，从而导致卵泡过度丢失和内分泌紊乱^[53]。人脐带来源的间充质干细胞移植可通过 AMPK/mTOR 信号通路抑制卵泡膜间质细胞的自噬功能，从而恢复 POI 大鼠的卵巢功能^[54]。目前暂无 *circSLC8A1* 调控卵巢颗粒细胞功能方面的相关报道，阐明 *circSLC8A1* 影响卵巢颗粒细胞功能的作用机制有助于揭示 bPOI 的发病机理，为寻找 bPOI 早期诊断性生物标志物以及治疗靶点提供新的见解。

因此，本研究将探索 *circSLC8A1* (*circ_0000994*) 在 bPOI 患者卵巢颗粒细胞中的表达及临床意义，以及对卵巢颗粒细胞增殖、凋亡、雌二醇 (Estradiol, E₂) 合成和自噬的影响及其作用机制，为 bPOI 发病机理的研究提供新的思路。

第一章 环状 RNA *circSLC8A1* 在生化异常期早发性卵巢功能不全患者卵巢颗粒细胞中的表达及临床意义

1 前言

2008年美国生殖医学学会（American Society for Reproductive Medicine, ASRM）提出用 POI 的概念来替代 POF，并建议用基础 FSH 水平、月经情况和生育能力作为评估指标，将 POI 患者的卵巢功能衰退进展分为正常、隐匿期、生化异常期和临床异常期 4 个阶段^[3]。绝大多数 POI 患者就诊时已到达终末阶段，即 POF，卵巢功能几近耗竭，并且此耗竭状态很难逆转，给未生育的女性患者带来了困扰，也给现代辅助生殖技术（Assisted Reproductive Technology, ART）带来了挑战。因此，我们应该重视隐匿期 POI 和 bPOI 患者的早期发现以及早期干预。POI 患者在卵泡完全耗竭前，通常会经历一个以月经紊乱为表现的卵巢功能下降期^[4]，通过对 POI 进行及早诊断，患者仍然有机会获得生育。因此，本研究将对 POI 的早期阶段即 bPOI 患者的发病机制进行研究，寻找 POI 潜在的候选基因以及新的治疗靶点。

POI 的发病机制尚不明确，原始卵泡池生成不足或卵泡耗竭加速被认为是 POI 的主要发病机制^[4]。而颗粒细胞在原始卵泡池的建立^[55]、卵泡生长发育^[56]和闭锁^[57]中扮演着重要角色。许多研究表明 POI 的发生与颗粒细胞功能障碍密切相关^[49, 50, 52, 53]。*circRNA* 由于呈闭合环状结构，因此对 *Rnase R* 核酸酶不敏感，*circRNA* 比线性 RNA 更为稳定，这一特点使 *circRNA* 在作为临床新型诊断标记物的开发应用上具有很大的优势。目前已发现多个 *circRNA* 可以通过调控卵巢颗粒细胞功能参与多囊卵巢综合征等生殖内分泌疾病的发病，但鲜有 *circRNA* 通过调控颗粒细胞功能参与 bPOI 发生发展的研究报道。

我们通过对前期在 bPOI 患者和对照组患者卵巢颗粒细胞中获取的 *circRNA* 差异表达谱进行分析^[9]，结合 *circRNA* 的差异表达倍数、在颗粒细胞中的表达水平以及序列保守性，最终筛选了 *circSLC8A1* (*circ_0000994*) 进行深入研

究。*circSLC8A1* 是由 *SLC8A1* 基因产生的 circRNA，其广泛存在于脊椎动物中，且相对保守，表明 *circSLC8A1* 在物种进化过程中不可或缺。已有研究表明 *circSLC8A1* 在心血管疾病^[43]、帕金森病^[47]、癌症等疾病^[40]中发挥重要功能，但 *circSLC8A1* 在卵巢功能调控以及 bPOI 中的作用尚不清楚，仍有待进一步研究。

2 实验材料

2.1 实验对象

本研究已获得南方医科大学南方医院医学伦理委员会的批准，并且该研究纳入的患者均已签署知情同意书。本研究分别募集了52例接受常规促排卵治疗的bPOI患者和52例与之匹配的对照组患者，收集其废弃的卵泡液和卵巢颗粒细胞。本研究中bPOI组（研究组）以及对照组患者的纳入和排除标准如下：

1.1.1 bPOI组患者的纳入标准包括：

①患者年龄24-39岁；②患者在月经第2-4天测血清基础 $10 \text{ IU/L} \leq \text{FSH} < 25 \text{ IU/L}$ ，测定至少2次，两次测定间隔大于4周；③患者经阴道或肛门超声检查，双侧卵巢的总窦状卵泡计数（Antral Follicle Counting, AFC） ≤ 7 个，测定至少2次，两次测定间隔大于4周；④患者抗苗勒氏管激素（Anti-Müllerian Hormone, AMH） $\leq 1.1 \text{ ng/mL}$ 。

1.1.2 对照组患者的纳入标准包括：

①患者年龄24-39岁；②既往月经规律，月经周期24-35天；③因单纯输卵管因素和/或男方因素就诊并接受IVF/ICSI-ET治疗；④患者月经第2-4天测血清基础 $\text{FSH} < 10 \text{ IU/L}$ ，测定至少2次，两次测定间隔大于4周；⑤患者经阴道或肛门超声检查，双侧卵巢 $\text{AFC} > 7$ 个，测定至少2次，两次测定间隔大于4周。⑥患者 $\text{AMH} > 1.1 \text{ ng/mL}$ 。

1.1.3 bPOI组和对照组患者的排除标准包括：

①患者年龄 > 40 岁；②存在染色体核型异常；③存在与POI相关的自身免疫病，包括桥本甲状腺炎、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、干燥综合症等；

④既往有卵巢手术史、放化疗史等；⑤合并其他妇科生殖内分泌疾病，如子宫内膜异位症、多囊卵巢综合征、子宫腺肌症等。

1.1.4 患者临床信息的获取：

根据患者的病历和就诊记录，记录纳入患者的基本信息，包括姓名、年龄、月经周期、身体质量指数(Body Mass Index, BMI)和不孕年限等；记录患者在月经第 2-4 天测血清基础 E₂、基础孕酮 (progesterone, P₄)、基础 FSH 和基础黄体生成素 (Luteinizing Hormone, LH) 和 AMH 水平；记录患者经阴道或肛门超声检查，双侧卵巢的 AFC 数量；同时记录患者接受促排卵治疗的相关信息，例如获卵数等。

2.2 主要使用仪器和耗材

实验仪器和耗材一览表

List of the used laboratory apparatuses and consumable

仪器名称	生产厂家
台式低温离心机	美国 Thermo 公司
水平低温离心机	美国 Thermo 公司
超净工作台	新加坡 ESCO 公司
高压灭菌器	日本 Hirayama 公司
漩涡振荡仪	中国江苏麒麟医用仪器厂
制冰机	中国宁波格兰特公司
超微量分光光度计	美国 Thermo 公司
PCR 八联管	美国 GeneCodex 公司
PCR 仪	美国 Bio-Rad 公司
罗氏 480 荧光定量 PCR 仪	美国罗氏公司
- 80℃超低温冰箱	日本 SANYO 公司
低温冰箱	中国海尔公司
微量移液枪	德国 Eppendorf 公司
无 RNase 移液器吸头	美国 Kirgen 公司
无 RNase 离心管	美国 Axygen 公司

无菌巴氏吸管 美国巴罗克公司

2.3 主要使用实验试剂

实验试剂一览表

List of the used experiment reagents

试剂名称	生产厂家
1×PBS 缓冲液	美国 HyClone 公司
10×PBS 缓冲液	中国北京雷根公司
红细胞裂解液	美国 Sigma-Alorich 公司
Percoll 细胞分离原液	美国 Sigma-Alorich 公司
RNase-Free Water	美国 Sigma 公司
RNAiso Plus	日本 Takara 公司
逆转录试剂盒	日本 Takara 公司
TB Green™ Premix Ex Taq™ II	日本 Takara 公司
无水乙醇、氯仿、异丙醇	中国广东广州化学试剂厂

2.4 主要使用试剂的配置方法

- ①50% Percoll 细胞分离液的配制方法：percoll 细胞分离液、10×PBS 缓冲液和 1×PBS 缓冲液按 9:1:10 的比例配制，充分摇匀后于 4℃冰箱保存；
- ②75%的无水乙醇配制方法：无水乙醇和 RNase-Free 水按 3:1 的比例配制，充分摇匀后于 4℃冰箱保存；

3 研究方法

3.1 卵泡液颗粒细胞的收集

研究组和对照组患者进行控制性促排卵治疗，在 GnRHa 和/或 HCG 注射 34-36h 后，患者在超声引导下经阴道后穹窿穿刺全部大小 $\geq 10\text{mm}$ 的卵泡，然后使用负压抽吸卵泡液，去除卵丘复合物后，将同一患者的废弃卵泡液收集于无

菌杯中，并立即进行颗粒细胞的提取。

3.2 卵泡液颗粒细胞的提取

颗粒细胞的提取采用既往报道的 Percoll 密度梯度离心法^[58]，步骤如下：

(1) 超净工作台提前紫外线消毒 30 分钟，所用实验试剂及耗材均不含 RNase；

(2) 在超净工作台中将卵泡液转移至 50mL 的无菌离心管，去除肉眼可见的组织块及血块后，移至 4℃ 水平低温离心机离心，400g×10min；

(3) 弃上清，往离心管内加入 1×PBS 10mL，轻轻吹打混匀后移至 4℃ 水平低温离心机离心，400g×10min；

(4) 将上清弃掉，用移液枪向离心管中加入 4mL 的 1×PBS 溶液，然后用移液枪轻轻地吹打混匀；

(5) 另外取一个无菌的 15mL 离心管，先加入 50% Percoll 液 3-5mL，然后用巴氏吸管将 (4) 中的细胞悬液缓慢地加入，移至 4℃ 水平低温离心机离心，400g×20min；

(6) 将离心管取出，可见离心管内液体分层明显，遂用巴氏吸管将中间薄雾状细胞层吸出，滴入到新的 15mL 离心管内，并加入 1×PBS 5mL 清洗 1 次，移至 4℃ 水平低温离心机离心，1000rpm×5min；

(7) 弃上清，往管内加入 1-2 mL 的红细胞裂解液，充分混匀后，放置于冰上 10-15min，然后转移至预冷至 4℃ 的水平低温离心机内离心，1000rpm×5min；

(8) 弃上清，用 1×PBS 5mL 清洗细胞 2 次，并转移至 1.5mL 的无 RNase 离心管中，期间用移液枪吸取少量的细胞悬液，滴入细胞计数板上进行计数；

(9) 根据计数结果，向细胞沉淀内加入适量的 RNAiso Plus 裂解液，然后用力吹打混匀，于室温静置 5min 后，进行后续 RNA 的提取，或转移至 -80℃ 超低温冰箱进行保存。

3.3 颗粒细胞总 RNA 的提取

(1) 将加了 RNAliso Plus 裂解液的标本置于冰上，往里面加入 1/5 体积的氯仿，上下颠倒混匀或用振荡仪震荡混匀，在室温下放置 5min 后，转移至 4℃ 预冷的离心机中离心，12000rpm×15min；

(2) 离心后将样本取出，肉眼可见液体明显分层，用移液枪小心吸取溶液最上层的透明液体，并转移至新的无 RNA 酶离心管中，要注意不能吸取到中间层的白色雾状沉淀和下层的有色液体；

(3) 继续向管中加入相同体积的异丙醇，充分颠倒混匀后，在室温下放置 15min 左右后，转移至 4℃ 预冷的离心机中离心，12000rpm×15min；

(4) 离心后将样本取出，肉眼可见管底有白色的 RNA 沉淀，轻轻地吸弃上清液后，往 RNA 沉淀中加入冷的 75%乙醇溶液 1mL，然后上下颠倒数次，转移至 4℃ 预冷的离心机中离心，7500rpm×5min，清洗 2-3 次；

(5) 弃上清，置于室温进行干燥，待白色沉淀干燥成半透明后，用移液枪吸取适量的无 RNase 水加入管内充分溶解；

(6) 将样本转移至冰上，利用紫外分光光度计检测 RNA 浓度和纯度，并记录各样本的 RNA 浓度、OD260/280 值和 OD260/230 值。提取的总 RNA 可直接进行后续逆转录实验，或转移至 -80℃ 超低温冰箱进行短期保存。

3.4 颗粒细胞 RNA 逆转录为 cDNA

3.4.1 去除基因组 DNA

使用 Takara 逆转录试剂盒，先将上述所提的颗粒细胞 RNA 用 200μL 的 EP 管根据如下反应体系进行配制，配好后将 EP 管瞬离几秒，达到混匀反应体系的目的，并放置于 PCR 仪中进行反应，42℃×2min，4℃×∞。

1μg RNA 的 5μL/10μL 反应体系配制方法：

试剂名称	10μL 体系	20μL 体系
gDNA Eraser	0.5μL	1.0μL
5×gDNA Eraser Buffer	1.0μL	2.0μL

RNase Free dH ₂ O	(3.5-500/X) μL	(7.0-1000/X) μL
Total RNA	500/X μL	X μL
Total	5.0 μL	10.0 μL

X 为测得样品的 RNA 浓度，RNase Free dH₂O 水补足至 3.5 μL/7 μL。

3.4.2 RNA 逆转录为 cDNA

将上述已去除基因组 DNA 的 RNA 进行如下体系的配制，配好后将 EP 管瞬离几秒，达到混匀反应体系的目的，并放置于 PCR 仪中进行反应，37 °C ×15min，85 °C ×5s，4 °C ×∞。

1 μg RNA 的 10 μL/20 μL 逆转录反应体系的配制方法：

试剂名称	10 μL 体系	20 μL 体系
5×PrimeScript buffer 2	2.0 μL	4.0 μL
RT Prime Mix	0.5 μL	1.0 μL
PrimeScript RT Enzyme Mix I	0.5 μL	1.0 μL
RNase Free dH ₂ O	2.0 μL	4.0 μL
步骤 3.6.1 的 RNA 反应液	5.0 μL	10.0 μL
Total	10.0 μL	20.0 μL

3.5 颗粒细胞 cDNA 进行 qRT-PCR

(1) PCR 引物的设计和合成：通过 circBase 和 NCBI 数据库获得人 circRNA 及 mRNA 序列，利用 circPrimer 软件和 Primer-Blast 网站设计和验证特异性的 PCR 引物。本研究所使用的引物序列均由上海生工设计和合成，本研究主要合成的引物序列如下：

表 1-1 PCR 引物序列一览表

Table 1-1 List of the PCR primer sequences

引物名称	引物序列(5'-3')
<i>circSLC8A1-F</i>	ATCGAAGGGACTGCCAGAGG
<i>circSLC8A1-R</i>	GGTGAAAGACTTAATCGCCGC
<i>GAPDH-F</i>	ACCATCTTCCAGGAGCGAGA

<i>GAPDH</i> -R	GACTCCACGACGTACTCAGC
-----------------	----------------------

(2) 避光配制 20 μ L 的 PCR 反应体系，配制方法如下：

试剂名称	用量
SYBR [®] premix Ex Taq [™] 2 \times	10.0 μ L
PCR Forward Primer (10 μ M)	0.4 μ L
PCR Reverse Primer (10 μ M)	0.4 μ L
RNase Free dH ₂ O	7.2 μ L
cDNA	2.0 μ L
Total	20.0 μ L

配好反应体系后，加入到 PCR 八联管，设置 3 个复孔，加样后瞬离几秒，立即上机，利用 LightCycler 480 System Real Time PCR 仪器进行 qRT-PCR，PCR 扩增条件如下：

反应温度	时间	循环次数
95 $^{\circ}$ C	30 sec	1 \times
95 $^{\circ}$ C	5 sec	40 \times
60 $^{\circ}$ C	20 sec	
95 $^{\circ}$ C	5 sec	1 \times
60 $^{\circ}$ C	60 sec	
95 $^{\circ}$ C	0 sec	
50 $^{\circ}$ C	30 sec	1 \times

扩增完成后，导出每个孔荧光信号达到设定阈值时所需循环数（即 CT 值），*GAPDH* 作为内参，利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 公式计算目的基因的相对表达量。

3.6 统计学分析

本研究主要使用 SPSS 16.0 软件(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)进行统计学分

析。利用独立样本 t 检验来检验 bPOI 患者组与对照组中 *circSLC8A1* 的表达差异有无统计学意义；使用 Pearson 相关系数分析 *circSLC8A1* 表达水平与患者临床参数之间的相关性；绘制受试者工作特征曲线（Receiver Operator Characteristic Curve, ROC curve），根据 ROC 的曲线下面积（Area Under the Curve, AUC）评估 *circSLC8A1* 用于鉴别 bPOI 的敏感性和特异性。数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm SD$) 表示，设双侧检验， $P < 0.05$ 被认为差异有统计学意义。

4 实验结果

4.1 bPOI 组和对照组患者的临床信息比较

我们一共收集了 104 例患者的卵巢颗粒细胞，包括 52 例 bPOI 组患者和 52 例对照组患者的卵巢颗粒细胞。通过对数据进行分析，如表 1-2 所示，两组患者的年龄、BMI、血清基础 E_2 和基础 P4 水平无统计学差异，bPOI 组患者的血清基础 FSH 和基础 LH 水平均高于对照组患者，而 AMH、AFC 和获卵数均明显低于对照组。

表 1-2 用于 qRT-PCR 分析的 bPOI 组和对照组患者的基本信息

Table 1-2 Characteristics of bPOI and control participants for qRT-PCR analyses.

Characteristics	bPOI (n = 52)	Control (n = 52)	P-value
Age (years)	33.810 ± 4.025	32.670 ± 3.394	0.123
BMI (kg/m ²)	21.218 ± 2.722	22.023 ± 2.674	0.131
E ₂ (pg/mL)	42.497 ± 51.241	40.038 ± 19.163	0.751
FSH (mIU/mL)	14.403 ± 3.809	6.681 ± 1.401	<0.001***
LH (mIU/mL)	8.639 ± 8.464	5.144 ± 1.767	0.006**
P4 (ng/mL)	0.452 ± 0.348	0.357 ± 0.382	0.186
AFC	4.596 ± 2.051	15.077 ± 3.980	<0.001***
AMH (ng/ml)	0.486 ± 0.347	3.261 ± 1.815	<0.001***
No. of oocytes retrieved	2.539 ± 2.437	13.577 ± 7.952	<0.001***

：P < 0.01, *：P < 0.001.

4.2 circSLC8A1 在 bPOI 组卵巢颗粒细胞中的表达明显下调

我们利用 qRT-PCR 检测 *circSLC8A1* (*circ_0000994*) 在 bPOI 组和对照组卵巢颗粒细胞的表达差异, 如图 1-1 所示, *circSLC8A1* 在 bPOI 组卵巢颗粒细胞的表达明显下调 ($P < 0.01$), 差异有统计学意义。

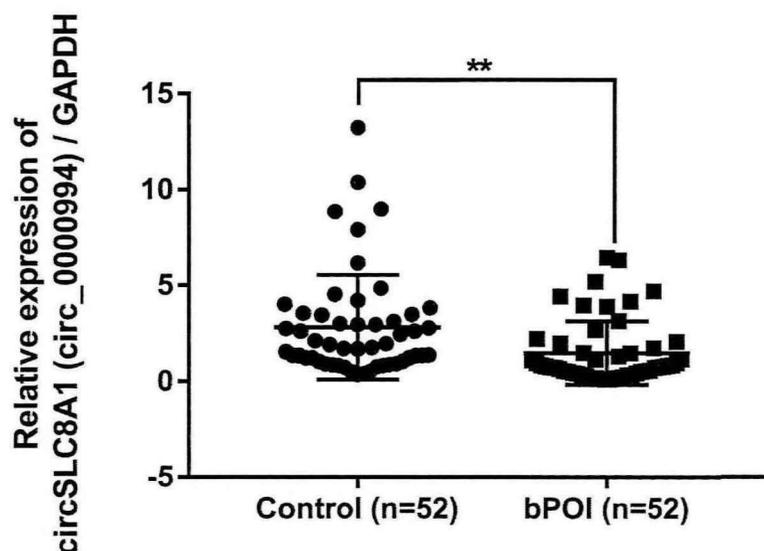


图1-1 bPOI组和对照组患者卵巢颗粒细胞*circSLC8A1*的表达水平

Figure 1-1 The expression levels of *circSLC8A1* in the granulosa cells from bPOI and control patients

符合纳入标准的52例bPOI患者和52例对照组患者的卵巢颗粒细胞提取RNA后, 进行qRT-PCR检测两组间*circSLC8A1*的表达水平, *GAPDH*作为内参。**: $P < 0.01$ 。

4.3 circSLC8A1 的表达水平与患者临床数据的相关性分析

我们通过对 104 例患者卵巢颗粒细胞 *circSLC8A1* 的表达水平与患者临床数据进行 Pearson 相关性分析, 结果如表 1-3 所示, *circSLC8A1* 的表达水平与患者年龄和血清基础 FSH 水平之间存在负相关关系, 与 AMH、AFC 和获卵数之间存在正相关关系, 而与其他临床信息无明显相关关系。

表1-3 *circSLC8A1* (*circ_0000994*)的表达水平与患者临床数据的Pearson相关性分析

Table 1-3 Pearson's rank correlation coefficients of the expression of *circSLC8A1* (*circ_0000994*)

and patients' characteristics.

Characteristics	R	P-value
Age (years)	-0.269	0.006**
BMI (kg/m ²)	0.077	0.437
E ₂ (pg/mL)	-0.042	0.675
FSH (mIU/mL)	-0.288	0.003**
LH (mIU/mL)	-0.100	0.530
P4 (ng/mL)	-0.108	0.321
AFC	0.420	<0.001***
AMH (ng/ml)	0.421	<0.001***
No. of oocytes retrieved	0.195	0.047*

n = 104; *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001.

4.4 评估 *circSLC8A1* 诊断 bPOI 患者的价值

为了评估 *circSLC8A1* 对 bPOI 患者的诊断价值，我们进行了 ROC 曲线分析，结果如图 1-2 所示，AUC 达到 0.726，95% 的置信区间为 0.627–0.825，其敏感度为 88.5%，其特异性为 53.8%，AUC 在 0.7~0.9 时被认为具有一定的准确性，提示 *circSLC8A1* 对 bPOI 患者具有一定的诊断价值。

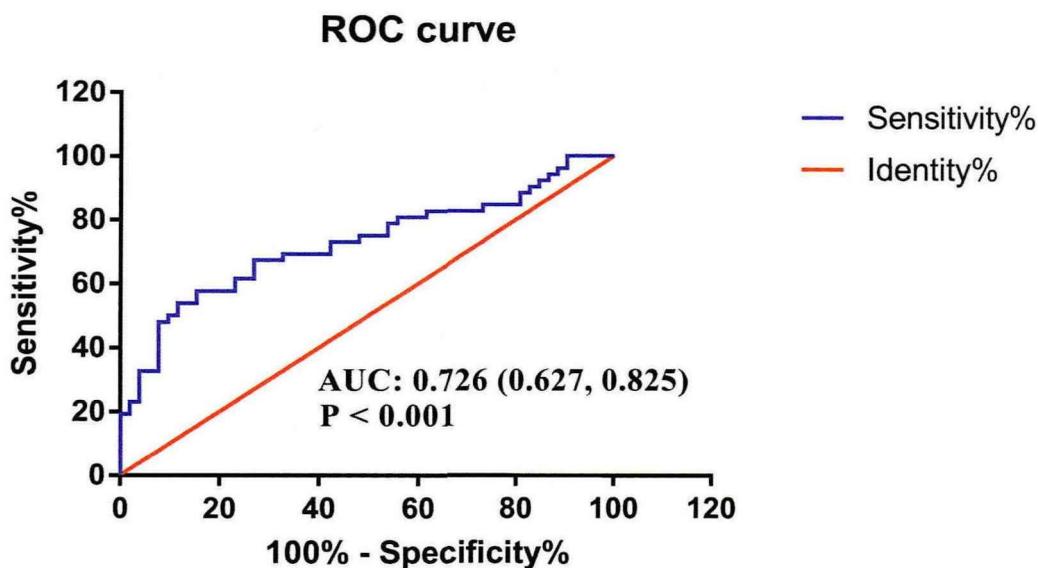


图 1-2 ROC 曲线分析 *circSLC8A1* 对 bPOI 患者的诊断价值

Figure 1-2 ROC curve analysis of the diagnostic value of *circSLC8A1* in patients with bPOI

5 讨论

本研究通过 qRT-PCR 检测发现 *circSLC8A1* 在 bPOI 患者卵巢颗粒细胞中的表达水平相对于对照组明显下调，且与患者年龄和血清基础 FSH 水平之间存在负相关关系，与 AMH、AFC 和获卵数之间存在正相关关系，提示 *circSLC8A1* 的表达水平可能与女性卵巢储备功能相关，可能与 POI 及其相关不孕症的发生关系密切。由于 circRNA 具有稳定的闭合环状结构，能耐受核酸酶的影响，其表达相对线性 RNA 更为稳定，因此能很好地作为疾病新型生物标志物。通过制作 ROC 曲线发现 *circSLC8A1* 对 bPOI 患者具有一定的诊断价值，因此 *circSLC8A1* 具有作为 bPOI 诊断生物标志物的潜力。

5.1 *circSLC8A1* 可能与 bPOI 的发病相关

我们前期对 8 例 bPOI 患者与 8 例对照组患者卵巢颗粒细胞进行 circRNA 芯片测序，发现 *circSLC8A1* (*circ_0000994*) 在 bPOI 患者卵巢颗粒细胞中表达显著下调 (Fold Change \geq 2.0 且 P<0.05)^[9]，并通过扩大样本 qRT-PCR 实验证实芯片的结果可靠，*circSLC8A1* 的异常表达可能对颗粒细胞功能产生影响，与

bPOI 的发病相关。

血清基础 FSH 水平是 POI 的重要诊断标准, 通过 Pearson 相关系数分析发现 *circSLC8A1* 表达水平与 FSH 水平存在明显负相关关系, 提示卵巢颗粒细胞中下调的 *circSLC8A1* 可能与 bPOI 中升高的 FSH 水平相关。此外, 卵巢储备功能减退 (Diminished Ovarian Reserve, DOR) 与 POI 具有相似的病因^[59]。POI 的早期阶段可表现为 DOR, 部分女性 40 岁前发生的重度 DOR 患者可演变为 POI。因此, 我们利用 Pearson 相关系数分析了 *circSLC8A1* 表达水平与卵巢储备相关指标的相关性。其中, 年龄是卵巢储备的最重要指标, 女性卵巢内的卵子随着年龄的增加而逐渐减少, 自 32 岁起明显减少, 到 37 岁以后衰退更为明显, 并且 POI 的发病率随着年龄的增加有升高的趋势。另外, AMH 和 AFC 是卵巢储备功能相关性最强的独立预测因素, 具有检测方法简单和不同月经周期间变化幅度小等优点^[60]。许多研究表明 AFC 与原始卵泡数量呈正相关^[61-63]。在本研究中, Pearson 相关系数分析结果显示 *circSLC8A1* 表达水平与年龄存在负相关关系, 并且与 AMH、AFC 和获卵数存在正相关关系, 提示 *circSLC8A1* 可能与 bPOI 患者原始卵泡池受损、卵巢储备功能衰退、获卵数降低有关。卵巢颗粒细胞的功能状态与原始卵泡池的建立、卵母细胞质量、卵泡生长发育以及卵巢储备密切相关。因此 *circSLC8A1* 可能通过调控颗粒细胞功能来影响卵泡的功能, 从而参与 bPOI 的发病进程, 这仍需更进一步的研究来明确。

5.2 *circSLC8A1* 具有作为 bPOI 早期诊断生物标志物的潜力

POI 的进展可能会持续很长一段时间, 然而大多数患者是在生育能力严重下降的临床异常期被诊断, 错过了最佳助孕时间。因此, 在 POI 早期 (隐匿期或生化异常期) 寻找早期潜在生物标志物和治疗靶点显得尤为重要。circRNA 是一类丰富而保守的 RNA, 大多数 circRNA 的表达量较低, 其丰度约为相应线性 RNA 的 5%-10%^[28]。然而, 一些 circRNA 由于其高稳定性而在细胞中积累, 其表达甚至能超过相应线性 RNA 表达的 10 倍以上^[29, 30]。核酸酶一般通过识别线性 RNA 分子末端而发挥作用, 由于 circRNA 具有稳定的闭合环状结构, 因

此比线性 RNA 更能耐受住核酸酶的影响。因此, *circRNA* 由于其结构和功能特性(稳定性、特异性和敏感性), 其作为新型诊断性生物标志物和治疗靶点具有潜在的应用前景。

目前, 大量的研究表明 *circRNA* 在肾脏疾病、心血管疾病和多种肿瘤中可能是有前景的诊断和/或预后生物标志物以及潜在的治疗靶点^[64, 65]。有研究报道 *circSLC8A1* 可作为急性缺血性心脏病心源性猝死的辅助诊断标志物^[66]。在女性生殖内分泌疾病领域, *circASPH*^[67]、*hsa_circ_0075691*、*hsa_circ_0075692* 和 *hsa_circ_0085997*^[68] 可能是 PCOS 潜在的诊断性生物标志物。*circATRNL1*^[69]、*circZFPM2*^[70]、*circPIP5K1A*^[71] 和 *circ_0001649*^[72] 等在子宫内膜异位症中异常表达, 可能是子宫内膜异位症潜在的生物标志物。而在 POI 的研究中, 有研究报道 bPOI 患者卵巢颗粒细胞中表达上调的 *circEMSY* 和 *circTRIM24* 有可能通过调控颗粒细胞的 DNA 损伤修复、凋亡和激素合成功能参与 POI 的发病^[36]。另一项研究检测了 POI 患者及正常对照组血浆中 *circRNA* 的差异表达谱, 发现有 12 条显著上调的 *circRNA* 和 23 条显著下调的 *circRNA*^[37]。我们前期研究建立了 bPOI 患者和对照组患者卵巢颗粒细胞的 *circRNA* 差异表达谱, 也发现在 bPOI 中有 133 条显著上调的 *circRNA* 和 424 条显著下调的 *circRNA*^[9]。这些差异表达的 *circRNA* 可能是寻找 bPOI 诊断生物标志物的候选基因。

我们通过制作 ROC 曲线发现 *circSLC8A1* 对 bPOI 患者具有一定的诊断价值, 提示 *circSLC8A1* 具有作为 bPOI 诊断生物标志分子的潜力, 当然后续还需要扩大样本量来进行验证以及更进一步的研究。

6 小结

与正常对照组相比, *circSLC8A1* 在 bPOI 患者卵巢颗粒细胞中表达明显下调, 其表达水平与患者年龄和血清基础 FSH 水平之间存在负相关关系, 与 AMH、AFC 和获卵数之间存在正相关关系, 提示 *circSLC8A1* 有望作为卵巢储备功能评估的生物标志物。此外, *circSLC8A1* 还具有诊断 bPOI 患者的潜力。

第二章 环状 RNA circSLC8A1 调控卵巢颗粒细胞的增殖、凋亡和雌二醇合成的作用机制

1 前言

circRNA 是一类具有调控功能的 ncRNA，具有闭合环状结构，广泛存在于真核细胞转录组中，在不同的组织以及不同发育阶段中具有表达特异性。circRNA 主要来自编码基因的外显子，少部分来自编码基因的内含子、UTR 区域、基因间区或 ncRNA 基因位点。因此有一部分 circRNA 可能是由一个或多个外显子构成，也可能仅由内含子构成，或者由外显子和内含子共同构成。circRNA 是由 mRNA 前体（pre-mRNA）经反向剪接（Back-Splicing）形成的，目前报道的环化机制主要有以下 3 种：内含子反向互补序列驱动环化、RNA 结合蛋白（RBPs）驱动环化和套索驱动环化^[73, 74]。和普通线性 RNA 一样，circRNA 的同一个基因位点可由于剪接位点等因素的改变而产生多个转录本。细胞质丰富的 circRNA 可通过作为 miRNA 分子海绵、蛋白海绵、蛋白支架和蛋白翻译模板等来调控基因表达^[75]。此外，一些细胞核丰富的 circRNA 可通过影响剪接和转录过程而促进基因表达。

circSLC8A1 已被发现通过直接结合或间接调控影响与死亡、分化、增殖或应激相关信号通路的活性，参与疾病的发生发展过程。有研究发现 *circSLC8A1* 通过调控 *miR-133a-3p/CDIP1* 信号通路影响心肌细胞凋亡^[39]。*circSlc8a1* 可以作为心肌细胞内 *miR-133a* 的内源性海绵，减轻压力过载诱导的心肌肥大^[43]。*circSLC8A1* 通过调控 *miR-130b/miR-494/PTEN* 信号轴抑制膀胱癌的进展^[46]。*circSLC8A1* 通过竞争性结合 *miR-671* 调控 PTEN/PI3K/AKT 信号通路，从而影响乳腺癌的进展^[42]。*circSLC8A1* 通过靶向 *miR-106b-5p/FOXJ3* 信号轴抑制非小细胞肺癌细胞的增殖和侵袭^[40]。*circSLC8A1* 通过海绵吸附 *miR-21* 调控细胞增殖、血管生成、细胞迁移、上皮向间质转化、MAPK 信号通路和趋化因子信号通路，在前列腺癌中发挥抑癌作用^[41]。*circSLC8A1* 通过靶向 *miR-214-5p/CDC27*

信号轴抑制胶质瘤细胞的增殖和侵袭，在胶质瘤中发挥抑制肿瘤的作用^[76]。*circSLC8A1* 可能影响细胞氧化应激过程，与帕金森病发病有关^[47]。然而，*circSLC8A1* 通过调控颗粒细胞何种功能和何种信号通路参与 bPOI 发病仍有待阐明。

卵巢颗粒细胞产生多种类固醇激素和生长因子，可以通过调控卵巢颗粒细胞增殖、凋亡和卵泡液形成等，进而影响卵泡的生长、成熟和闭锁^[77]。其中最主要的类固醇激素包括 E₂ 和孕激素，这两种性激素可通过负反馈下丘脑垂体性腺轴调控卵巢的功能，此外，E₂ 和孕激素也是十分重要的抗凋亡因子。*FSHR* 是卵巢中卵泡生长和排卵所必需的。*FSHR* 在卵巢颗粒细胞中的表达被精确调控，以诱导正常的卵泡发生。颗粒细胞中 *FSHR* 的表达随着健康卵泡的生长而增加，而在闭锁卵泡中则减少^[78]。FSH 可通过 *FSHR* 发挥作用^[79]，使细胞内第二信使 cAMP 水平升高，进而激活其下游 PKA 通路，促进卵巢颗粒细胞 E₂ 的合成和分泌。已知 FSH 可诱导芳香化酶 *CYP19A1* 的表达，*CYP19A1* 是体内雌激素合成的限速酶，直接影响体内 E₂ 的水平^[80]。近年来，circRNA 被发现在卵巢颗粒细胞激素合成中发挥着重要作用。外泌体 *circLDLR* 的缺失抑制了 *CYP19A1* 的表达，导致受体细胞的 E₂ 合成和分泌减少^[81]。*circTRIM24* 和 *circEMSY* 通过调控 *FSHR* 蛋白表达影响人卵巢颗粒细胞的 E₂ 合成^[36]。但 *circSLC8A1* 调控卵巢颗粒细胞 E₂ 合成的作用机制仍有待阐明。

因此，本部分研究将深入探索 *circSLC8A1* 对卵巢颗粒细胞增殖、凋亡和 E₂ 合成的影响及其作用机制，为揭示 bPOI 的发病机制提供新的研究思路。

2 实验材料

2.1 实验细胞

2.1.1 人原代卵巢颗粒细胞：

本研究所使用的人卵巢黄素化颗粒细胞（Human Luteinized Granulosa Cell, hLGC）均来源于生殖医学中心接受 IVF/ICSI-ET 治疗的患者。患者的纳入标准如下：

①患者年龄范围为 25-30 岁，BMI 在 18-24kg/m²之间；②患者既往月经规律，月经周期 24-35 天；③患者因单纯输卵管因素和/或男方因素接受 IVF/ICSI-ET 治疗；④患者第 2-4 天测血清基础 FSH < 10IU/L、LH≤10mIU/mL 及 E₂≤50pg/mL；⑤取卵周期中获卵数≥4 个。

2.1.2 人卵巢颗粒细胞系：

人卵巢颗粒细胞系——KGN，由山东大学秦莹莹教授慷慨赠予，来源于日本 RIKEN BioResource Center。KGN 细胞系被认为具有正常颗粒细胞的大多数生理特征，包括表达功能性的 FSHR 和具有芳香化酶活性，以及与正常颗粒细胞中观察到的相同的甾体发生和 fas 介导的凋亡模式。因此，KGN 细胞系被认为是了解人类卵巢颗粒细胞中类固醇发生、细胞生长和凋亡调控的有用模型 [82]。

2.2 仪器设备与耗材

实验仪器和耗材一览表

List of the used laboratory apparatuses and consumable

仪器名称	生产厂家
台式低温离心机	美国 Thermo 公司
水平低温离心机	美国 Thermo 公司
超净工作台	新加坡 ESCO 公司
全外排生物安全柜	新加坡 ESCO 公司
高压灭菌器	日本 Hirayama 公司
漩涡震荡仪	中国江苏麒麟医用仪器厂
制冰机	中国宁波格兰特公司
超微量分光光度计	美国 Thermo 公司
PCR 八联管	美国 GeneCodex 公司
PCR 仪	美国 Bio-Rad 公司
罗氏 480 荧光定量 PCR 仪	美国罗氏公司
- 80℃超低温冰箱	日本 SANYO 公司
低温冰箱	中国海尔公司

微量移液枪	德国 Eppendorf 公司
无 RNase 移液器吸头	美国 Kirgen 公司
无 RNase 无菌离心管	美国 Axygen 公司
无菌巴氏吸管	美国巴罗克公司
凝胶成像分析系统	美国 APLEGEN 公司
微波炉	中国美的公司
琼脂糖水平电泳仪	中国上海天能科技公司
水平摇床	中国海门其林贝尔公司
垂直板电泳仪与转印系统	美国 Bio-Rad 公司
磁力搅拌器	中国海门其林贝尔公司
转印滤纸 Bio-Rad 公司	美国 Bio-Rad 公司
PVDF 膜	美国 Millipore 公司
化学发光分析仪	中国上海天能公司
电子分析天平	中国上海梅特勒-托利公司
激光共聚焦扫描显微镜	德国 ZEISS 公司
细胞恒温培养箱	美国 Thermo 公司
电热恒温水浴箱	中国上海一恒科技公司
细胞计数板	美国 Thermo Fisher 公司
细胞培养板 (96 孔、24 孔、12 孔、6 孔)	美国 Corning 公司
共聚焦培养皿	美国 Corning 公司
细胞培养瓶	美国 Corning 公司
细胞培养皿 (大、中、小)	美国 Corning 公司
细胞冻存管	美国 Corning 公司
梯度降温冻存盒	美国 Thermo 公司
滤菌器 (孔径 0.22 μm)	美国 Millipore 公司
无菌注射器	中国湖南平安医疗器械公司
细胞刮刀	美国巴罗克公司
载玻片和盖玻片	中国江苏世泰公司
多维高清流式细胞分析仪	美国 BD 公司
电动倒置和正置荧光显微镜	日本 Olympus 公司

全自动电化学发光免疫分析仪

美国罗氏公司

2.3 主要使用实验试剂

实验试剂一览表

List of the used experiment reagents

试剂名称	生产厂家
1×PBS 缓冲液	美国 HyClone 公司
10×PBS 缓冲液	中国北京雷根公司
红细胞裂解液	美国 Sigma-Alorich 公司
Percoll 细胞分离原液	美国 Sigma-Alorich 公司
无 RNase 水	中国广东广州锐博公司
RNAiso Plus	日本 Takara 公司
逆转录试剂盒	日本 Takara 公司
TB Green™ Premix Ex Taq™ II	日本 Takara 公司
无水乙醇、氯仿、异丙醇、甲醇、Tween - 20	中国广东广州化学试剂厂
DMEM/F12 培养基	美国 Gibco 公司
Lipofectamine RNAi MAX	美国 Invitrogen 公司
RFect ^{PM} siRNA 原代细胞小核酸转染试剂	中国常州百代科技股份有限公司
Opti-MEM 溶液	美国 Invitrogen 公司
siRNA	中国广东广州锐博公司
胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS)	美国 Gibco 公司
0.25%含 EDTA 的胰酶和不含 EDTA 的胰酶	美国 HyClone 公司
二甲基亚砷 (Dimethyl Sulphoxide, DMSO)	美国 Sigma 公司
Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 试剂	日本 Dojindo 公司
EdU 试剂盒	中国广东广州锐博公司
细胞凋亡检测试剂盒	中国上海贝博公司
100× BIOMYC-3	中国杭州弗德生物科技有限公司

青霉素、链霉素双抗	中国杭州弗德生物科技有限公司
细胞基因组 DNA 提取试剂盒	中国北京天根生化科技有限公司
5×TAE 缓冲液	中国北京天根生化科技有限公司
Agarose 琼脂糖 low EEO	中国北京天根生化科技有限公司
2×Taq PCR MasterMix II	中国北京天根生化科技有限公司
GeneGreen 核酸染料	中国北京天根生化科技有限公司
DNA Marker I	中国北京天根生化科技有限公司
PrimeSTAR Max DNA Polymerase	日本 Takara 公司
RIPA 裂解液	中国上海碧云天公司
PMSF 蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂	中国上海碧云天公司
BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型)	中国上海碧云天公司
5×Loading buffer	中国北京雷根公司
过硫酸铵	中国上海碧云天公司
30% Acr-Bis 溶液	中国合肥 Biosharp 公司
1.5M Tris HCL pH 8.8	中国北京雷根公司
1M Tris HCL pH 6.8	中国北京雷根公司
10% SDS 溶液	中国北京雷根公司
TEMED	中国上海碧云天公司
甘氨酸	德国 Biofroxx 公司
Tris-base	德国 Biofroxx 公司
十二烷基硫酸钠 (SDS)	中国北京雷根公司
牛血清白蛋白 (BSA) 粉末	中国上海碧云天公司
预染蛋白 Marker	美国 Thermo 公司
一抗稀释液	中国上海碧云天公司
ECL 发光液	美国 Bio-Rad 公司
HRP 标记山羊抗兔二抗	美国 Abcam 公司
HRP 标记山羊抗小鼠二抗	美国 Cell Signaling Technology 公司
兔抗人 Bax 一抗	美国 Cell Signaling Technology 公司
兔抗人 Bak 一抗	美国 Cell Signaling Technology 公司
兔抗人 Caspase-9 一抗	美国 Cell Signaling Technology 公司

兔抗人 PKA 一抗	美国 Abcam 公司
小鼠抗人 GAPDH	中国武汉 Proteintech 公司
TBS 粉末	中国上海双螺旋生物科技有限公司
4%多聚甲醛	中国北京雷根公司
RNA-FISH 试剂盒	中国上海吉玛制药技术有限公司
细胞核/浆 RNA 分离试剂盒	美国 Life 公司
Triton X-100	中国上海碧云天公司
Alexa Fluor 488 山羊抗小鼠 IgG (H+L)	中国上海碧云天公司
Rnase R	广州吉赛生物科技有限公司
血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒	中国北京天根生化科技有限公司
雄烯二酮	美国 Sigma 公司
Forskolin	美国 MedChemExpress 公司
重组 FSH (rFSH, 果纳芬)	瑞士 Merck Serono 公司
透明质酸酶	美国 Worthington 公司

2.4 主要使用试剂的配置方法

①50% Percoll 细胞分离液的配制方法：Percoll 细胞分离液、10×PBS 缓冲液和 1×PBS 缓冲液按 9:1:10 的比例配制，充分摇匀后用无菌滤器过滤备用；

②含 10% FBS 培养基的配制方法：DMEM/F12 和澳洲胎牛血清按 9：1 的比例配制，然后加入 1×BIOMYC-3 和双抗（青霉素和链霉素）。

③细胞冻存液的配制方法：澳洲胎牛血清和 DMSO 按 9：1 的比例配制而成。

④siRNA 工作液的配制方法：将 siRNA 粉末 3000-4000rpm 离心 1min，用无 RNase 水将 siRNA 粉末融解为 20μM 浓度，然后分装于-20℃保存，避免反复冻融；

3 研究方法

3.1 人卵巢黄素化颗粒细胞的提取、培养与鉴定

3.1.1 人原代颗粒细胞的提取与培养

- (1) 立即将收集于无菌杯中的患者卵泡液转移至生物安全柜处理，先将卵泡液倒入 50mL 无菌离心管中，常温下 400g×10min；
- (2) 弃上清，向细胞沉淀中加入 4-5 mL 1×PBS，混匀后轻轻加入到 4-5mL 的 50% Percoll 分离液，常温下 600g×10min；
- (3) 离心后可见管内液体分层明显，然后用巴氏吸管吸取中间薄雾状细胞层，滴入到新的 15mL 离心管内，并加入 1×PBS 5mL 清洗 1 次，常温下 1500rpm×5min；
- (4) 弃上清，向细胞沉淀中加入 2%透明质酸酶 1 mL，混匀后 37℃消化 10min，然后常温下离心，1500rpm×5min；
- (5) 弃上清，细胞沉淀用 1×PBS 3-5mL 洗涤 1-2 次，常温下 1500rpm×5min；
- (6) 弃上清，细胞沉淀中加入 2 mL 无菌的红细胞裂解液，常温下孵育 3min 后，1500rpm×5min；
- (7) 弃上清，细胞沉淀用 1×PBS 3-5mL 洗涤 1-2 次，常温下 1500rpm×5min；
- (8) 弃上清，细胞沉淀用含有 10%FBS 的培养基重悬，细胞计数后按实验需求接种所需细胞密度至细胞培养皿和培养板中，然后放置于含 5% CO₂ 的 37℃ 恒温细胞培养箱中培养。

3.1.2 人原代颗粒细胞的鉴定——细胞免疫荧光实验

- (1) 将上述提取的人原代颗粒细胞接种到铺有爬片的 12 孔板中，待细胞生长密度达到 70%-80%时，进行下一步处理；
- (2) 弃培养基，12 孔板中加入 1×PBS，轻轻清洗细胞 2 次，每次 5min，清洗完毕后弃 PBS，加入 4%多聚甲醇溶液，在室温下静置 15min 左右；
- (3) 孵育完毕后弃固定液，用 1×PBS 清洗细胞 2 次，5min/次，加入 0.3%的 TritonX-100 孵育 5-10min；
- (4) 弃液，用 1×PBS 清洗细胞 2 次，每次 5min，然后用 5% BSA 室温下封闭 2h；
- (5) 按 1: 200 提前稀释 FSHR 一抗原液，弃封闭液后，加入稀释好的一抗溶液孵育，放置于 4℃过夜；

- (6) 次日将一抗液回收至管中，然后用 1×PBS 洗涤细胞 3 次，10min/次；
- (7) 避光，按 1: 500 提前稀释二抗原液，弃 PBS 液后，加入稀释好的二抗溶液，在室温下孵育 90min 左右；
- (8) 孵育完毕后回收二抗溶液，然后避光条件下用 1×PBS 洗涤细胞 3 次，10min/次；
- (9) 吸弃 PBS 溶液后，取出爬片，载玻片先滴入几滴抗荧光淬灭封片液（含 DAPI），然后将爬片的细胞面紧贴封片液，注意不能有气泡，然后避光孵育 5-10min 后，在电动正置荧光显微镜下拍摄。

3.2 KGN 细胞培养相关实验

3.2.1 KGN 细胞复苏

- (1) 从液氮罐中取出保存有 KGN 细胞的冻存管，并将细胞冻存管迅速转移至 37℃ 的水浴锅内融解，为了使细胞冻存液更快速地融解，期间可轻轻晃动冻存管；
- (2) 准备一个无菌的 10mL 离心管，加入 5mL 含 10%FBS 的培养基，并加入上述充分融解好的细胞冻存液，轻轻混匀后常温下离心，800rpm × 3min；
- (3) 离心完毕后，将上清液弃去，向细胞沉淀中加入 1mL 含有 10%FBS 的培养基，并轻轻混匀，随后转移至 25cm² 的培养瓶中，并加入 5mL 含有 10%FBS 的培养基，轻轻摇匀；
- (4) 细胞培养瓶上标记上复苏的日期、细胞种类和培养人姓名等，放置在含 5% CO₂ 的 37℃ 恒温细胞培养箱中培养。

3.2.2 KGN 细胞传代

- (1) 复苏后的 KGN 细胞培养 2 天后，首先在显微镜下观察细胞的密度和状态，当细胞状态良好、无污染、细胞密度达到 80-100% 时即可传代；
- (2) 用移液枪吸弃旧培养基，加入 1×PBS 2mL 洗涤细胞 2 次，然后加入 1mL 含 EDTA 的胰酶消化，在镜下观察到细胞形态变圆、胞质收缩（2min 左右）后，加入 2mL 含有 10%FBS 的培养基中和消化；

(3) 立即用移液器轻轻吹打细胞，每个角落的细胞吹打 2-3 次，使贴壁细胞悬浮于培养基中；

(4) 细胞悬液转移至 10mL 的无菌离心管中，细胞培养瓶先在显微镜下确保无比较多的细胞残留，然后将细胞悬液常温下离心，800rpm × 3min；

(5) 弃上清，细胞沉淀用 1-2mL 含 10%FBS 的培养基重悬，细胞计数后按实验需求接种所需的细胞数量至细胞培养皿和培养板中，原细胞培养瓶可按 1:3~1:4 进行传代。

3.2.3 KGN 细胞冻存

(1) 将细胞状态好、传代次数少的细胞冻存起来。以 25cm² 的细胞培养瓶为例，待细胞密度达到 80%-100% 时，用含 EDTA 的胰酶消化 2min 左右；

(2) 消化完毕后加入 2mL 含 10%FBS 培养基中和，然后用移液器轻轻吹落细胞，转移至 10mL 无菌离心管中常温下离心，800rpm × 3min；

(3) 弃上清，细胞沉淀用 900μL 的 FBS 重悬，然后加入 100μL 的 DMSO 轻轻混匀后，转移至细胞冻存管内；

(4) 将标记好的冻存管放入提前在 4℃ 预冷的梯度降温冻存盒内，然后转移至 -80℃ 冰箱过夜，次日再放入液氮灌中进行长期保存。

3.3 细胞转染

针对 *circSLC8A1* 和对照组的 siRNA 由广州锐博公司设计和合成，它们的序列如下：

表 2-1 siRNA 序列

Table 2-1 Sequences of siRNA

siRNA	sense(5'-3')	anti-sense(5'-3')
si_circSLC8A1-1	AUUGUUAGGUUGUGACAGUTT	ACUGUCACAACCUAACAAUTT
si_circSLC8A1-2	GAUGAAAUUGUUAGGUUGUTT	ACAACCUAACAAUUUCAUCTT
si_NC	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT	ACGUGACACGUUCGGAGAATT

首先，根据实验需求接种所需的细胞数量至细胞培养板或培养皿，转染试

剂的用量根据培养板或皿的规格相应地调整。以 12 孔板转染为例，转染步骤如下：

(1) 将培养瓶状态好的细胞消化下来后离心，弃上清，加入含 10%FBS 的培养基重悬细胞，用细胞计数板计数，接种 3 万/孔至 12 孔板中，摇匀；

(2) 第二天观察细胞状态好、无污染，密度达 30%-40%左右时，即可进行转染（24 小时内）；

(3) 配制 A 液：取一无菌的 1.5mL 离心管，加入 50 μ L/孔的 Opti-MEM 无血清培养基和 3 μ L/孔的 siRNA（20 μ M），轻轻混匀；

(4) 配制 B 液：另取一无菌的 1.5mL 离心管，加入 50 μ L/孔的 Opti-MEM 无血清培养基和 2.5 μ L/孔的 Lipofectamine RNAiMAX 或 4 μ L/孔的 RFect^{PM}siRNA 原代细胞小核酸转染试剂，轻轻混匀后，常温下静置 5min；

(5) 将配制好的 A 液和 B 液轻轻地混在一起，于常温下静置 15-20min，待其充分结合；

(6) 12 孔板弃旧培，加入不含抗生素的 10%FBS 培养基 900 μ L，并将结合好的 AB 液加入其中，轻轻摇匀后，放置在细胞培养箱内培养 48-72 h。

3.4 细胞总 RNA 的提取

(1) 弃旧培，细胞用 1 \times PBS 清洗 2 次，将加了 RNAiso Plus 裂解液的标本置于冰上，往里面加入 1/5 体积的氯仿，上下颠倒混匀或用振荡仪震荡混匀，在室温下放置 5min 后，转移至 4 $^{\circ}$ C 预冷的离心机中离心，12000rpm \times 15min；

(2) 离心后将样本取出，肉眼可见液体明显分层，用移液枪小心吸取溶液最上层的透明液体，并转移至新的无 RNA 酶离心管中，要注意不能吸取到中间层的白色雾状沉淀和下层的有色液体；

(3) 继续向管中加入相同体积的异丙醇，充分颠倒混匀后，在室温下放置 15min 左右后，转移至 4 $^{\circ}$ C 预冷的离心机中离心，12000rpm \times 15min；

(4) 离心后将样本取出，肉眼可见管底有白色的 RNA 沉淀，轻轻地吸弃上清液后，用移液枪向 RNA 沉淀中加入 75%乙醇溶液 1mL，然后轻轻地上下颠倒

数次，转移至 4℃ 预冷的离心机中离心，7500rpm×5min，清洗 2-3 次；

(5) 弃上清，置于室温进行干燥，待白色沉淀干燥成半透明后，用移液枪吸取适量的无 RNase 水加入管内，并充分溶解沉淀；

(6) 立即将样本转移至冰上，利用紫外分光光度计检测 RNA 浓度和纯度，并记录各样本的 RNA 浓度、OD260/280 值和 OD260/230 值。

3.5 细胞 RNA 逆转录为 cDNA

3.5.1 去除基因组 DNA

使用 Takara 逆转录试剂盒，先将上述所提的颗粒细胞 RNA 用 200μL 的 EP 管根据如下反应体系进行配制，配好后将 EP 管瞬离几秒，达到混匀反应体系的目的，并放置于 PCR 仪中进行反应，42℃×2 min，4℃×∞。

1μg RNA 的 5μL/10μL 反应体系配制方法：

试剂名称	10μL 体系	20μL 体系
gDNA Eraser	0.5μL	1.0μL
5×gDNA Eraser Buffer	1.0μL	2.0μL
RNase Free dH ₂ O	(3.5-500/X) μL	(7.0-1000/X) μL
Total RNA	500/XμL	XμL
Total	5.0μL	10.0μL

X 为测得样品的 RNA 浓度，RNase Free dH₂O 水补足至 3.5μL/7μL。

3.5.2 RNA 逆转录为 cDNA

将上述已去除基因组 DNA 的 RNA 进行如下体系的配制，配好后将 EP 管瞬离几秒，达到混匀反应体系的目的，并放置于 PCR 仪中进行反应，37℃×15min，85℃×5 s，4℃×∞。

1μg RNA 的 10μL/20 μL 逆转录反应体系的配制方法：

试剂名称	10μL 体系	20μL 体系
5×PrimeScript buffer 2	2.0μL	4.0 μL
RT Prime Mix	0.5μL	1.0 μL
PrimeScript RT Enzyme Mix I	0.5 μL	1.0 μL

RNase Free dH ₂ O	2.0 μL	4.0 μL
步骤 3.5.1 的 RNA 反应液	5.0 μL	10.0 μL
Total	10.0 μL	20.0 μL

3.6 细胞 cDNA 进行 qRT-PCR

(1) PCR 引物的设计和合成: 通过 circBase 和 NCBI 数据库获得人 circRNA 及 mRNA 序列, 利用 circPrimer 软件和 Primer-Blast 网站设计和验证特异性的 PCR 引物。本研究所使用的引物序列均由上海生工设计和合成, 主要合成的引物序列如下:

表 1-1 PCR 引物序列一览表

Table 1-1 List of the PCR primer sequences

引物名称	引物序列(5'-3')
<i>circSLC8A1-F</i>	ATCGAAGGGACTGCCAGAGG
<i>circSLC8A1-R</i>	GGTGAAAGACTTAATCGCCGC
<i>linear-SLC8A1-F</i>	AAACCATCGAAGGGACTGC
<i>linear-SLC8A1-R</i>	TTACCTTGACTGATATTGTTTTGACA
<i>GAPDH-F</i>	ACCATCTTCCAGGAGCGAGA
<i>GAPDH-R</i>	GACTCCACGACGTACTCAGC
<i>divergent-GAPDH Forward</i>	GAAGGTGAAGGTCGAGTCGAPDH
<i>divergent-GAPDH Reverse</i>	GAAGATGGTGATGGGATTTC
<i>CYP19A1-F</i>	GAGAATTCATGCGAGTCTGGA
<i>CYP19A1-R</i>	CATTATGTGGAACATACTTGAGGACT
<i>FSHR-F</i>	AACACCCATCCAAGGAATGG
<i>FSHR-R</i>	GGGCTAAATGACTTAGAGGGACAA
<i>pre-GAPDH-F</i>	CCACCAACTGCTTAGCACC
<i>pre-GAPDH-R</i>	CTCCCCACCTTGAAAGGAAAT
<i>18S-F</i>	GGAGTATGGTTGCAAAGCTGA
<i>18S-R</i>	ATCTGTCAATCCTGTCCGTGT

(2) 首先避光配制 20μL 的 PCR 反应体系, 配制方法如下:

试剂名称	用量
------	----

第二章 环状 RNA circSLC8A1 调控卵巢颗粒细胞的增殖、凋亡和雌二醇合成的作用机制

SYBR® premix Ex Taq™ 2×	10.0 μL
PCR Forward Primer (10μM)	0.4 μL
PCR Reverse Primer (10μM)	0.4 μL
RNase Free dH ₂ O	7.2 μL
cDNA	2.0 μL
Total	20.0 μL

配好反应体系后，加入到 PCR 八联管，设置 3 个复孔，加样后瞬离几秒，立即上机，利用 LightCycler 480 System Real Time PCR 仪器进行 qRT-PCR，PCR 扩增条件如下：

反应温度	时间	循环次数
95℃	30 sec	1×
95℃	5 sec	40×
60℃	20 sec	
95℃	5 sec	1×
60℃	60 sec	
95℃	0 sec	
50℃	30 sec	1×

扩增完成后，导出每个孔荧光信号达到设定阈值时所需循环数（即 CT 值），*GAPDH* 作为内参，利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 公式计算目的基因的相对表达量。

3.7 颗粒细胞基因组 DNA 提取

颗粒细胞基因组 DNA 的提取根据北京天根生化科技有限公司提供的试剂盒说明书进行，具体步骤如下：

- (1) 贴壁的颗粒细胞先用胰酶消化制成细胞悬液，1×PBS 清洗 1-2 次，然后离心 10,000rpm×1min；
- (2) 倒尽上清，用移液枪吸取 200μL 的 GA 缓冲液加入细胞沉淀中，用涡旋振荡器充分振荡混匀；
- (3) 向每管细胞加入 20μL 的 Proteinase K，充分混匀后，继续向每管细胞加入 200μL 的 GB 缓冲液，充分颠倒混匀后，在 70℃ 的条件下，孵育 10min，直

至溶液从浑浊变得清亮后，瞬离数秒；

(4) 继续向管子里加入 200 μ L 的无水乙醇溶液，利用涡旋振荡器振荡混匀数十秒，期间液体中有可能会出现絮状沉淀，然后瞬离数秒；

(5) 将吸附柱 CB3 放入干净的收集管中，将上述溶液缓慢地加入吸附柱内，离心 12,000rpm \times 30s；

(6) 将收集管内的废液倒弃，然后吸附柱重新放入原收集管中，用移液枪向吸附柱内加入 500 μ L 的缓冲液 GD（使用前需确保已加入无水乙醇），放置于离心机中离心，12,000rpm \times 30s；

(7) 倒掉管子内的液体后，将吸附柱重新放入对应的收集管中，吸取 600 μ L 的 PW 漂洗液，并加进吸附柱内，注意 PW 漂洗液在使用前需按说明书加入适量的无水乙醇溶液，然后于离心机中离心，12,000rpm \times 30s；

(8) 重复操作步骤（7），倒掉废液后，空转 12,000rpm \times 2min，然后室温放置数分钟，目的是彻底去除残余的漂洗液 PW，避免漂洗液中的无水乙醇影响后续的 PCR 实验；

(9) 漂洗完毕后，重新取一个干净的收集管，将吸附柱放入其中，然后吸取 50-200 μ L 的 TE 洗脱液，滴加至吸附膜中，在室温的条件下，放置 5min，离心 12,000rpm \times 2min；

(10) 将上述溶液转移至不含 RNase 酶的 1.5mL 离心管中，并利用分光光度计对其 DNA 浓度和纯度进行检测；

3.8 普通 PCR 扩增

3.8.1 用于 Sanger 测序的 PCR 扩增步骤如下：

PCR 反应液的配制（50 μ L 体系）

试剂	使用量	终浓度
PrimeSTAR Max Premix (2 \times)	25 μ L	1 \times
Primer-F	10~15pmol	0.2-0.3 μ M
Primer-R	10~15pmol	0.2-0.3 μ M
cDNA template	<200ng	—

RNase-Free Water	补至 50 μ L	—
PCR 反应条件		
反应温度	时间	循环次数
98 $^{\circ}$ C	10sec	} 35 \times
55 $^{\circ}$ C	15sec	
72 $^{\circ}$ C	5sec	

3.8.2 用于琼脂糖凝胶电泳的 PCR 扩增步骤如下：

PCR 反应液的配制 (20 μ L 体系)

试剂	使用量	终浓度
2 \times Taq PCR MasterMix II	10 μ L	1 \times
Primer-F	0.5 μ L	250nM
Primer-R	0.5 μ L	250nM
cDNA template	<1 μ g	—
RNase-Free Water	补至 20 μ L	—
PCR 反应条件		
反应温度	时间	循环次数
94 $^{\circ}$ C	3min	1 \times
94 $^{\circ}$ C	30sec	} 35 \times
58 $^{\circ}$ C	5sec	
72 $^{\circ}$ C	1min	
72 $^{\circ}$ C	5min	1 \times
4 $^{\circ}$ C	Holding	1 \times

3.9 琼脂糖凝胶电泳

(1) 1%琼脂糖凝胶的配制方法如下：首先利用电子天平准确称量 0.5 g 的 Agarose 琼脂糖粉末，并将其转移至锥形瓶中。先将 5 \times TAE 缓冲液用去离子水稀释成 1 \times TAE 缓冲液，然后向锥形瓶内加入 1 \times TAE 缓冲液 50mL，稍微摇匀后，放置于微波炉中加热约 5min，期间晃动锥形瓶加速其溶解，至溶液透明无颗粒即可；

(2) 将加热的凝胶溶液从微波炉取出，晃动锥形瓶，待其冷却到 50℃时，向凝胶溶液内加入 GeneGreen 核酸染料 5μL，并轻轻摇晃混匀；

(3) 晃动锥形瓶，继续等待凝胶溶液冷却至 30℃左右，倒入安装好的模具，注意不能有气泡，室温静置 30min；

(4) 待凝胶溶液凝固完全后，将梳子从凝胶中拔出，并将凝胶转移至水平电泳槽中，注意正负极不要放反，往里面加入适量的 1×TAE 缓冲液，液面超过凝胶 2mm 左右即可；

(5) 先在孔内分别加入 5μL DNA Marker I 和 RNA 样品，打开电源开关，调节电压至 100V×30min；

(6) 电泳结束后，先观察 Marker 的位置，满意后关闭电泳仪的电源，轻轻取出凝胶，并转移至凝胶成像分析系统，进行观察并拍摄。

3.10 验证 *circSLC8A1* (*circ_0000994*) 的环状结构

3.10.1 Sanger 测序

将 PCR 产物送上海生工生物工程股份有限公司进行 Sanger 双向测序。

3.10.2 RNase R 处理

(1) 将 1-10μg RNA 分成等量的两管，其中处理组那一管加入 2μL 的 10×Reaction Buffer 和 2U 的 RNase R，对照管则加入 2μL 的 10×Reaction Buffer；

(2) 两管 RNA 补 RNase-Free 水至终体积 20μL，混匀后 37℃×5min，然后保持 70℃×10min，目的是使 RNase R 失活；

(3) 两管 RNA 进行逆转录，并进行 qRT-PCR 分析 *circSLC8A1* 和 linear *SLC8A1* 的相对表达水平，步骤同研究方法 3.5 和 3.6。

3.11 RNA 的细胞内定位

3.11.1 颗粒细胞的核/浆 RNA 分离

颗粒细胞核/浆 RNA 的提取和分离根据 Life 公司提供的 PARISTM Kit 说明书进行，具体实验步骤如下：

(1) 首先将以下试剂按要求准备:

① 2×Lysis/Binding Solution 在使用前先加入 2-巯基乙醇溶液 415μL, 并充分混匀, 转移至 37℃ 水浴锅中预热 5–10min;

② 在使用 Wash Solution 2/3 前, 先往里加入 64mL 的无水乙醇, 并充分混匀后备用;

③ 吸取适量的 Elution Solution 于不含 RNase 的 1.5mL 离心管中, 使用前预热至 95–100℃。

(2) 收集 KGN 和人原代颗粒细胞 (5×10^6 个细胞左右): 收集 2 个大皿的 KGN 和人原代颗粒细胞, 用 1×PBS 清洗细胞 2 次, 然后用胰酶消化 2min 左右, 800rpm×3min 离心后, 弃上清, 用 2mL 的 1×PBS 清洗细胞 1 次, 800rpm×3min 离心后, 弃上清, 将细胞沉淀置于冰上。

(3) 向细胞沉淀中加入 500μL 的 Cell Fractionation Buffer, 轻轻吹打混匀, 置于冰上孵育 5–10min, 待其充分裂解细胞后, 于 4℃ 离心, $500g \times 3min$;

(4) 离心后, 小心吸取 450μL 左右的上清液于不含 RNase 的 1.5mL 离心管中, 标记为颗粒细胞的质 RNA, 并放置于冰上备用;

(5) 细胞沉淀再次加入 200μL 的 Cell Fractionation Buffer 轻轻吹打混匀, 于 4℃ 离心, $500g \times 1min$;

(6) 弃上清, 重复步骤 (5), 目的是将细胞核和细胞质彻底分离, 并完全去除残留的细胞质;

(7) 吸取 600μL 的 Cell Disruption Buffer 加入步骤 (6) 的管子中, 用力吹打混匀, 直到沉淀消失, 并标记为颗粒细胞的核 RNA, 放置于冰上备用;

(8) 将上述两个分别标记为颗粒细胞核和细胞质 RNA 的管子放置于室温下, 用移液枪分别加入等体积的 2×Lysis/Binding Solution, 并轻轻吹打混匀;

(9) 用移液枪向步骤 (8) 的两个管子内分别加入与 2×Lysis/Binding Solution 体积相同的无水乙醇溶液, 用移液枪轻轻混匀;

(10) 准备一个干净的不含 RNA 酶的过滤管, 并把过滤柱放入其中, 随后将步骤 (9) 中的混合液分别加入过滤柱内, 每次加入的液体量不能超过 700μL,

转移至提前 4℃ 预冷的离心机中离心，12000g ×30s；

(11) 离心后取出过滤管，将过滤管内的液体弃掉，并将过滤柱重新放入其中，重复步骤 (10)，直到过滤完步骤 (9) 中的所有混合液；

(12) 弃滤液，往过滤柱中轻轻加入 700μL 的 Wash Solution 1 溶液，于 4℃ 离心，12000g ×30s；

(13) 往过滤柱中轻轻加入 500μL 的 Wash Solution 2/3 溶液，于 4℃ 离心，12000g ×30s；

(14) 弃滤液，重复步骤 (13) 后，弃滤液，然后空转 15s，目的是完全去除洗涤液；

(15) 将过滤柱放入新的干净的收集管中，加入 40μL 提前预热至 95-100℃ 的 Elution Solution，于 4℃ 离心，12000g ×30s；

(16) 不更换收集管，继续向过滤柱中加入 10μL 的 Elution Solution，于 4℃ 再次离心，12000g ×30s。离心完毕后，利用分光光度计检测样本的 RNA 浓度和纯度；

(17) (可选) 当 RNA 浓度超过 200ng/μL 时，可用 LiCl 沉淀和浓缩 RNA，并去除其中的糖类和 DNA 污染物。向步骤 (15) 的管子中加入一定量的 LiCl Precipitation Solution，体积为 RNA 溶液体积的 1/2，然后放置于 -20℃ 冰箱中，反应 30min 以上；

(18) 反应完毕后，转移至提前 4℃ 预冷的离心机中离心，12000g ×15min；

(19) 离心后取出管子，将上清液吸弃，用移液枪向细胞沉淀中加入适量的 70% 的乙醇溶液，转移至提前 4℃ 预冷的离心机中离心，12000g ×10min；

(20) 心后取出管子，将上清液吸弃，放置于室温条件下干燥，沉淀干燥后，用移液枪向沉淀中加入适量的不含 RNase 水吹打混匀，利用分光光度计检测细胞核/质 RNA 的浓度和纯度，可放置于 -80℃ 冰箱短期保存，或直接进行逆转录和 qRT-PCR 实验。

3.11.2 RNA 荧光原位杂交 (Fluorescent in situ hybridization, RNA-FISH)

circSLC8A1 在颗粒细胞中的定位根据吉玛公司提供的 FISH 试剂盒说明书进

行，具体实验步骤如下：

(1) 试剂配制：

①0.1%的 Buffer A 的配制：按 1：999 的比例用 1×PBS 稀释 Buffer A，现配现用；

②Buffer C 母液为 20×，用去离子水稀释成 4×、2×和 1×；

③0.1% Buffer F 的配制：按 1：999 的比例用 1×PBS 稀释 Buffer F，现配现用；

(2) 接种 3×10^4 个细胞到预先放入细胞爬片的 12 孔板中，置于细胞培养箱中过夜，次日密度在 70%左右即可进行下一步操作；

(3) 弃培养基，用移液枪加入适量的 1×PBS 溶液，室温下洗涤细胞 2 次，5min/次；

(4) 将 PBS 溶液吸弃，12 孔板每孔分别加入 4%多聚甲醛 400 μ L，在室温条件下固定 15min 左右；

(5) 将 4%多聚甲醛固定液吸弃，12 孔板每孔分别加入 0.1%的 Buffer A 400 μ L，在室温条件下放置 15min；

(6) 将 0.1%的 Buffer A 溶液吸弃，用 1×PBS 清洗细胞 2 次，每次 5min；

(7) 弃液，每孔加入 400 μ L 2×Buffer C 后，放置于培养箱 37℃孵育 30min；

(8) Buffer E 提前在 73℃水浴预热 30min，直至液体变澄清透亮，然后避光用 Buffer E 配制探针混合液，探针工作浓度为 4 μ M，总体系为 400 μ L/孔，避光 73℃变性 5min；

(9) 步骤 (7) 弃液，每孔加入 400 μ L 步骤 (8) 中变性的探针混合液，然后放置于细胞培养箱内 37℃过夜；

(10) 次日弃探针混合液，每孔加入 400 μ L 提前预热至 42℃的 0.1% Buffer F 洗涤细胞 5min；

(11) 弃液，每孔加入 400 μ L 提前预热至 42℃的 2×Buffer C 洗涤细胞 5min；

(12) 弃液，每孔加入 400 μ L 提前预热至 42℃的 1×Buffer C 洗涤细胞 5min；

(13) 弃液，取出爬片，载玻片先滴入几滴抗荧光淬灭封片液（含 DAPI），

然后将爬片的细胞面紧贴封片液，注意不能有气泡，避光孵育 5-10min 后，在共聚焦显微镜下观察拍摄。

3.12 CCK-8 试剂检测颗粒细胞增殖

(1) 细胞接种到 96 孔板，1000-2000 个/孔，实验组和对照组分别设置 5 个复孔，放置在细胞培养箱内培养过夜；

(2) 次日转染目的 siRNA 和对照，然后向当天要检测的孔里加入 10 μ L 的 CCK-8 溶液，避光孵育 2h；

(3) 孵育完毕后，利用酶标仪测定波长在 450nm 处的吸光度，并连续检测 3 天以上，记录每天测得的 OD450 值。

3.13 EdU (ethynyl deoxyuridine) 试剂盒检测颗粒细胞增殖

(1) 细胞接种到 96 孔板，实验组和对照组分别设置 5 个复孔，次日转染目的 siRNA 和对照；

(2) 细胞转染 2 天后，在生物安全柜内按 1: 1000 的比例用含 10%FBS 的培养基稀释试剂 A，100 μ L/孔孵育 2 h；

(3) 将试剂 A 稀释液吸弃，用移液枪加入适量的 1 \times PBS，放置于低速摇床中，在室温条件下清洗 1-2 次，每次 5min。

(4) 将 PBS 液吸弃，96 孔板每孔加入 50 μ L 的 4%多聚甲醛溶液，放置于低速摇床中，在室温条件下摇 30min；

(5) 用移液枪吸弃 4%多聚甲醛溶液，96 孔板每孔加入 2mg/mL 甘氨酸溶液 50 μ L，放置于低速摇床中，在室温条件下摇 5min；

(6) 将甘氨酸溶液吸弃，用 1 \times PBS 清洗细胞，室温摇床 5min；

(7) 根据以下配方配制 Apollo 染色反应液，100 μ L/孔，室温摇床孵育 30min；

Apollo 染色反应液的配制方法（现配现用）

Apollo染色反应液

1mL

去离子水	938 μ L
Apollo®反应缓冲液 (试剂B)	50 μ L
Apollo®催化剂溶液 (试剂C)	10 μ L
Apollo®荧光染料溶液 (试剂D)	3 μ L
Apollo®缓冲添加剂 (试剂E)	9mg

(8) 弃液，每孔加入 100 μ L 0.5% TritonX-100 的 PBS 溶液，室温摇床清洗 3 次，每次 10min;

(9) 弃液，加强洗脱（可选）：每孔加入 100 μ L 甲醇清洗细胞，室温摇床 5min；弃液，然后用 1 \times PBS 清洗细胞，室温摇床 5min；

(10) 弃液，避光配制 1 \times Hoechst33342 反应液：按照 1：100 的比例用 ddH₂O 稀释试剂 F，96 孔板每孔加入 100 μ L 稀释好的试剂 F 溶液，放置于低速摇床中，在室温条件下摇 30min；

(12) 将试剂 F 溶液吸弃，用移液枪加入 100 μ L 的 1 \times PBS 溶液，放置于低速摇床中，在室温条件下洗涤细胞 2-3 次，每次 5min；

(13) 清洗完毕后，每孔加入 100 μ L 1 \times PBS 溶液，细胞避光转移至电动倒置荧光显微镜下，进行观察并拍摄。

3.14 颗粒细胞流式细胞凋亡的检测

(1) 接种适量的细胞于 6 孔板中，放置于培养箱过夜，次日转染 siRNA 和对照，操作同 3.3；

(2) 转染 48h 后，取出 6 孔板，将旧培养基收集于 10mL 的离心管中，用 1 \times PBS 清洗细胞 2 次后，用不含 EDTA 的胰酶消化细胞 2min 左右，立即用旧培养基终止消化，轻轻吹落细胞，收集细胞悬液于 10mL 的离心管中，4 $^{\circ}$ C 离心，1500rpm \times 5min；

(3) 弃上清，细胞沉淀用 1 \times PBS 清洗细胞 2 次，于 4 $^{\circ}$ C 离心，1500rpm \times 5min；

(4) 将上清吸弃，用移液枪向细胞沉淀中加入 1×Annexin V 结合液 400 μL ，并轻轻地混匀；

(5) 用移液枪向细胞悬液内加入 Annexin V-FITC 染色液 5 μL ，并轻轻混匀后，转移至 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 15min；

(6) 继续用移液枪向细胞悬液内加入 PI 染色液 10 μL ，然后用移液枪轻轻地混匀后，在避光的条件下，4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 5min；

(7) 立即用移液枪将细胞悬液转移至流式管内，并使用流式细胞仪对细胞凋亡进行检测。

3.15 颗粒细胞的总蛋白提取和蛋白质印迹法 (Western blot)

3.15.1 颗粒细胞的总蛋白提取

(1) 提前配制 RIPA 蛋白裂解液：RIPA 裂解液中分别 1×蛋白酶抑制剂、1×PMSF 以及 1×磷酸酶抑制剂，用移液枪充分混匀。

(2) 将处理好的细胞从培养箱取出，弃旧培养基，用移液枪吸取适量的 1×PBS 溶液清洗细胞 2-3 次，充分吸弃 1×PBS 后，随后加入配制好的 RIPA 蛋白裂解液；

(3) 将细胞培养板/皿置于冰上，并用干净的细胞刮刀刮下细胞，并转移至干净的 1.5mL 离心管中，然后用涡旋振荡器振荡几秒，冰上放置 30min，期间继续用涡旋振荡器震荡 2-3 次，然后转移至离心机中 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心，13000rpm×15min；

(4) 离心完成后，将离心管取出，用移液枪吸取 2 μL 的上层上清液，并加入干净的 96 孔板中备用，按步骤 3.15.2 对每个样本的蛋白浓度进行检测，其余上清液转移至新的 1.5mL 离心管中，并加入 1/4 体积的 5×Loading Buffer，混匀后置于 100 $^{\circ}\text{C}$ 沸水中煮 10min 使蛋白质变性，然后将蛋白置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

3.15.2 BCA 试剂盒检测样本蛋白浓度

(1) 提前将 0.5mg/mL 的蛋白标准液配置好，然后用移液枪向 96 孔板中分别加入 0 μL 、1 μL 、2 μL 、4 μL 、8 μL 、12 μL 、16 μL 和 20 μL 的蛋白标准液，并用

1×PBS 补足至 20 μ L/孔;

(2) 未知浓度的蛋白样本取 2 μ L 加入 96 孔板中, 然后加入 18 μ L 的 1×PBS 补足至 20 μ L;

(3) BCA 工作液现配现用: 试剂 B 和试剂 A 按 1: 50 的比例配制, 96 孔板每孔配 200 μ L, 轻轻混匀, 注意混匀过程中不要产生气泡, 转移至 37 $^{\circ}$ C 条件下孵育 30min;

(4) 反应完毕后, 采用酶标仪检测 96 孔板中各个样本在 562nm 波长处的吸光度, 然后绘制标准品浓度曲线, 计算目标蛋白的浓度。

3.15.3 蛋白免疫印迹实验 (Western blot)

(1) 准备和配制相关实验试剂: 、

①1×电泳缓冲液的配制: 用电子天平称取甘氨酸 18.80g、Tris -base 3.02g 和 SDS 1g, 用去离子水定容至 1000mL, 搅拌至其完全溶解;

②1×转膜液的配制: 准确称量 14.41g 的甘氨酸粉末、3.03g 的 Tris-base 粉末, 然后加入 ddH₂O 定容至 800mL, 混匀后加入 200mL 的甲醇, 搅拌至其完全溶解, 放置于冰上预冷;

③10%过硫酸铵的配制: 用电子天平称量 1g 的过硫酸铵粉末, 用去离子水定容至 10mL, 溶解后分装于-20 $^{\circ}$ C 避光保存, 避免反复冻融;

④TBST 清洗液的配制: 取 20g 的 TBS 粉末, 用 2L 的去离子水溶解, 然后加入 2mL 的 Tween-20, 充分混匀;

⑤5% BSA 封闭液的配制: 用电子天平称取 0.25g 的 BSA 粉末, 用 TBST 定容至 50mL, 然后充分混匀;

⑥一抗工作液的配制方法: 用一抗稀释液按 1: 1000 的比例稀释一抗原液, 混匀后置于 4 $^{\circ}$ C 保存;

⑦二抗工作液的配制方法: 二抗原液用 TBST 按 1:5000 的比例稀释, 混匀后置于 4 $^{\circ}$ C 保存。

(2) 分离胶和浓缩胶的配制:

①安装好配胶用的玻璃板, 用去离子水验漏后, 根据以下配方配制不同浓度的

分离胶 10mL (2 块分离胶) :

试剂名称 / 用量 (mL)	6%	8%	10%	12%	15%
去离子水	5.3	4.6	4.0	3.3	2.3
30% Acr-Bis	2.0	2.7	3.3	4.0	5.0
1.5M Tris HCL pH8.8	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
10% SDS	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
10% 过硫酸铵	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
TMEMD	0.008	0.006	0.004	0.004	0.004

用 50mL 离心管配好后, 充分混匀, 灌胶至离梳子下缘 1cm 左右, 每块玻璃板灌 5mL 左右, 马上加入无水乙醇溶液封胶, 在室温条件下放置约 30min, 期间不要挪动玻璃板;

②分离胶凝固后, 将封胶用的无水乙醇倒弃, 并使用滤纸将分离胶表面残留的液体吸干, 按以下配方配制 5%的浓缩胶 4mL:

试剂名称 / 用量 (mL)	5%
去离子水	2.7
30% Acr-Bis	0.67
1.0M Tris HCL pH6.8	0.5
10% SDS	0.04
10% 过硫酸铵	0.04
TMEMD	0.004

配制好浓缩胶后, 充分混匀, 快速加在分离胶的上方, 每块胶灌 2mL 左右, 然后插上梳子, 注意不要有气泡, 室温静置 10min;

(3) 蛋白上样: 安装好电泳装置, 拔去梳子, 将提取的蛋白样品充分融解, 蛋白的上样量为 20 μ g, 蛋白 marker 上样量为 3-4 μ L。

(4) 电泳: 上样完毕后, 立即安装电泳槽, 加入适量的 1 \times 电泳缓冲液, 然后打开电源开关, 调节为恒压模式, 电压 60V 跑 30min 左右, 待蛋白跑至浓缩胶和分离胶之间时, 即可调整电压至 90V, 蛋白跑至距胶下缘约 1 cm 时结束电泳;

(5) 转膜:

- ①电泳结束前，先将 PVDF 膜剪出与目的条带相同大小的条带，并标记；
- ②电泳结束后关闭电源，取出玻璃板，用去离子水洗净玻璃板上的电泳液后，用撬板将玻璃板轻轻撬开，并将凝胶转移至转膜液中，以蛋白 marker 为标准，根据目的蛋白的分子量将凝胶切成相应大小的条带；
- ③转膜夹两面分别铺上 2 张转印滤纸，浸润在提前预冷的 1×转膜液中，然后将切好的凝胶条带转移至转膜夹的转印滤纸上，再贴上预先剪好的并浸泡过甲醇的 PVDF 条带，在肉眼确认凝胶和 PVDF 条带之间没有气泡后，一次性将转膜夹夹紧，注意不能挪动条带；
- ④将转膜夹正确放置于电泳槽中，倒入提前预冷的 1×转膜液，同时将电泳槽放置于冰上，打开电源开关，调节为恒流模式，200mA 跑 90min 左右。

(6) 封闭的步骤：转膜完毕后将电源关闭，取出转有目的蛋白的 PVDF 膜，并用适量的 TBST 溶液清洗一次，然后将 PVDF 条带直接放进 5%BSA 封闭液中，在室温条件下，低速摇床封闭 1-2h。

(7) 抗体的孵育步骤：

- ①用适量 TBST 溶液清洗步骤 (6) 中封闭好的 PVDF 条带，摇床摇 5min 后，将 PVDF 条带浸泡在一抗稀释液中，4℃摇床孵育过夜；
- ②次日将蛋白膜取出，室温下用 TBST 溶液清洗蛋白膜 3 次，每次 10min，随后将蛋白膜取出，继续浸泡在二抗稀释液中，在室温条件下，低速摇床孵育 1h；
- ③孵育完毕，将蛋白膜置于 TBST 中室温清洗 3 次，5-10min/次。

(8) 化学发光法：避光，ECL 的 A 和 B 两种试剂按 1: 1 的比例配制发光液，蛋白膜先在滤纸上晾干，去除多余的 TBST 洗膜液，然后泡在发光液中几秒，充分浸润，然后将蛋白膜放置于化学发光仪内曝光；

(9) 蛋白条带的半定量分析：利用 Image J 软件对蛋白条带的相对表达量进行分析，首先计算目的蛋白和内参蛋白的灰度值，然后用目的蛋白的灰度值除以内参蛋白的灰度值得出目的蛋白相对表达量。

3.16 检测颗粒细胞上清液的 E₂ 浓度

- (1) 将 KGN 细胞接种于 6 孔板中，放置培养箱过夜，次日细胞密度达到 30-40% 时，转染 25nM 的 siRNA 和对照，放置培养箱中孵育 48 h；
- (2) 孵育完毕，弃旧培养基，用 1×PBS 清洗细胞 2 次，然后用胰酶将细胞消化下来，利用细胞计数板进行计数，接种 4 万/孔至 12 孔板中，培养过夜；
- (3) 次日弃旧培养基，加入含 100nM 雄烯二酮的无血清 DMEM/F12 培养基，放置于培养箱继续培养 24h；
- (4) 24h 后收集各组细胞上清液，4℃ 离心 3000rpm×10min，取上清液立即送检；
- (5) 利用全自动电化学发光免疫分析仪对细胞上清液的 E₂ 进行检测。

3.17 统计学分析

本研究主要采用 SPSS 16.0 或 GraphPad Prism 5 软件对实验结果进行统计学分析。利用 Student's *t* 检验分析和比较两组间计量资料有无统计学差异，所有分析结果用均数±标准差 ($\bar{x} \pm SD$) 表示，设双侧检验， $P < 0.05$ 被认为差异有统计学意义。

4 实验结果

4.1 人卵巢颗粒细胞的形态学观察

在倒置显微镜下观察分离后的人卵巢黄素化颗粒细胞：培养第 1 d 可见颗粒细胞贴壁生长，呈类圆形或椭圆形，细胞内可见黑色的颗粒状物质；培养 2-6 d 可见颗粒细胞明显增殖，细胞伸出细长伪足，细胞浆饱满，细胞内颗粒物质丰富；在培养至 7-8 d 后，颗粒细胞开始逐渐退化，部分出现脱颗粒现象，细胞伪足减少，形态类似于成纤维细胞，并且培养基中有较多漂浮的死细胞。

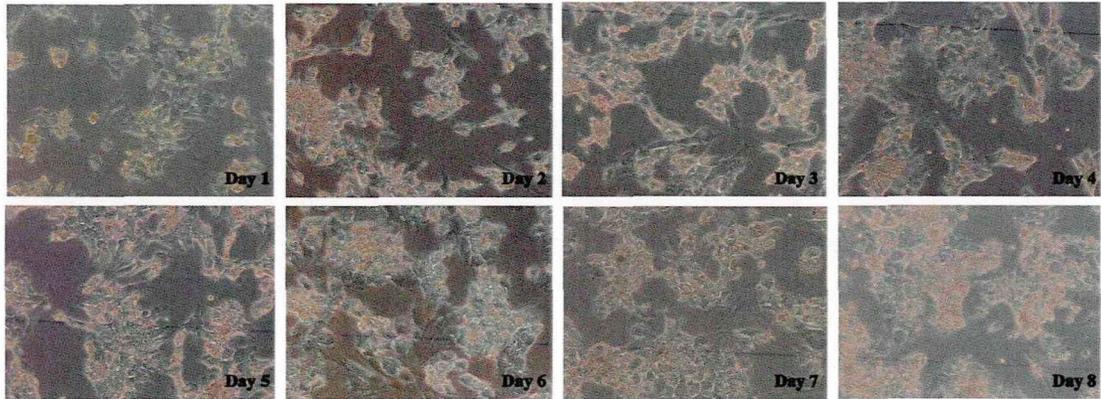


图 2-1 培养 1-8 d 的人卵巢黄素化颗粒细胞

Figure 2-1 Human ovarian luteinized granulosa cells were cultured for 1-8 days

通过密度梯度离心法分离出人卵巢颗粒细胞，然后接种至细胞培养板，放置培养箱培养 8 天，期间于倒置显微镜下进行细胞的形态学观察（200×）。

4.2 人原代颗粒细胞的鉴定

卵巢颗粒细胞是卵巢内唯一表达 FSHR 的细胞，FSHR 具有高度细胞特异性^[83]。培养第 3 天的原代颗粒细胞经 FSHR 免疫荧光鉴定，可见颗粒细胞的胞浆内有明显的红色荧光分布，通过计算纯度高达 95%以上，且状态好，表明提取的颗粒细胞纯度较高，可用于后续的功能研究。

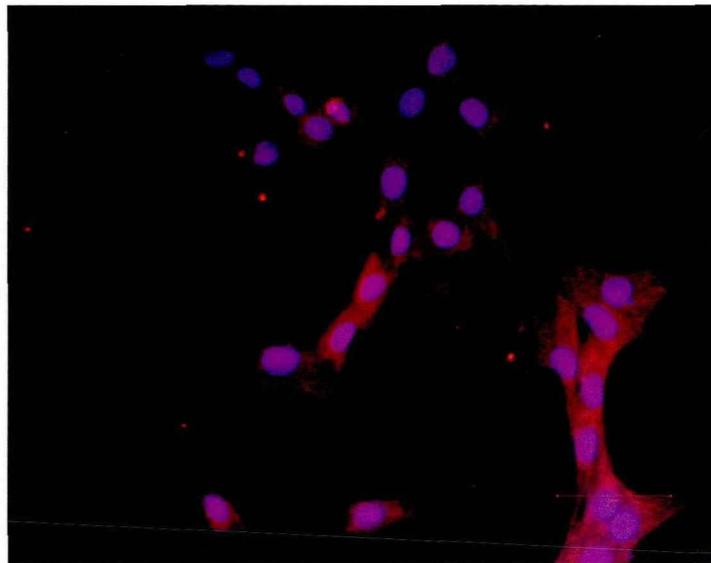


图 2-2 FSHR 免疫荧光鉴定人卵巢颗粒细胞

Figure 2-2 Identification of human ovarian granulosa cells by FSHR immunofluorescence

培养第 3 天的颗粒细胞进行细胞 FSHR 免疫荧光鉴定，红色荧光代表 FSHR，蓝色荧光代表 DAPI，标尺：50 μm。

4.3 circSLC8A1 (circ_0000994) 的环状鉴定

通过检索 circBase 和 UCSC 数据库发现，*circSLC8A1* (circ_0000994) 属于外显子来源的 circRNA (exonic circRNA)，来源于 *SLC8A1* 基因，是由外显子 1 经反向剪接环化而成，全长 1832 bp。Sanger 测序确认了 PCR 产物的序列信息与数据库中 *circSLC8A1* 的反向剪接位点序列 (Back-splicing junction) 相一致 (图 2-3)。琼脂糖凝胶电泳结果显示以 KGN 和原代颗粒细胞的 cDNA 和基因组 DNA (Genomic DNA, gDNA) 为模板，在 cDNA 中以发散引物 (Divergent Primer) 能检测到对应大小的条带，其与收敛引物 (Convergent Primer) 检测到的条带大小不同，并且在 gDNA 中检测不到对应大小的条带 (图 2-4)，表明 *circSLC8A1* 是反向成环的 circRNA。RNase R 消化实验结果显示在 RNase R 的消化作用下，线性 *SLC8A1* (linear *SLC8A1*) 的表达明显下降，而 *circSLC8A1* 的表达降低不明显 (图 2-5)，表明 *circSLC8A1* 呈环形，因此比线性 RNA 更耐受 RNase R 的消化。

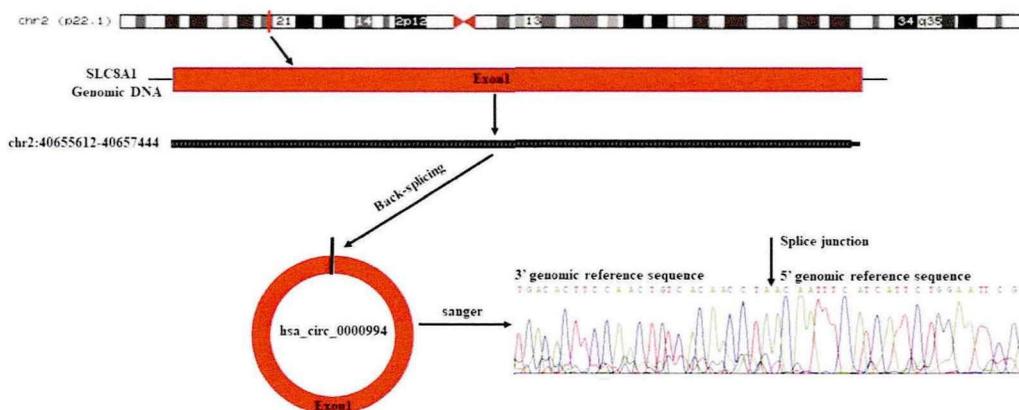


图 2-3 circSLC8A1 的成环示意图和 Sanger 测序

Figure 2-3 Schematic diagram of the circularization of *circSLC8A1* and Sanger sequencing

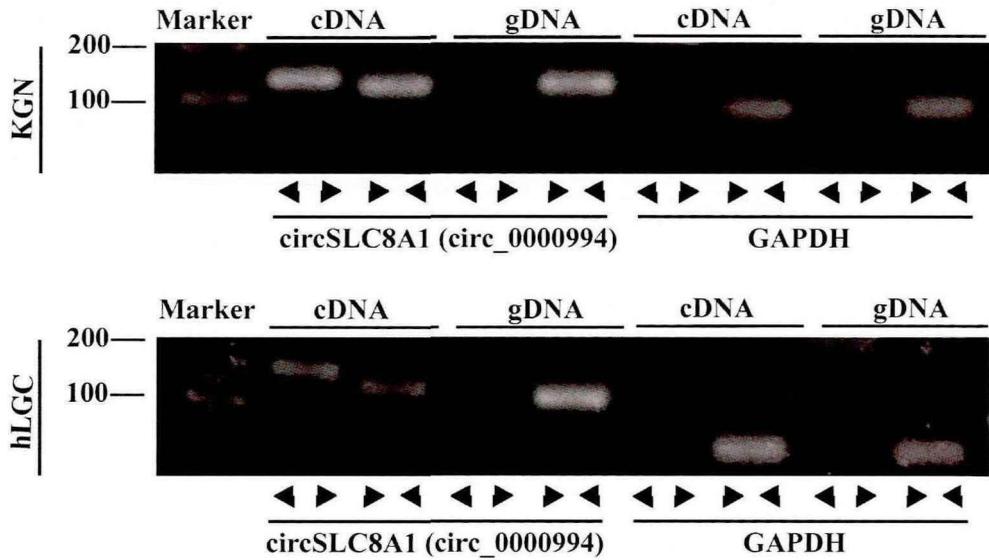


图 2-4 琼脂糖凝胶电泳显示 RT-PCR 产物为 *circSLC8A1* 的环状结构

Figure 2-4 Agar-gel electrophoresis exhibited the product of RT-PCR to exhibit the circular structure of *circSLC8A1*.

以 KGN 和人卵巢黄素化颗粒细胞 (Human Luteinized Granulosa Cell, hLGC) 的 cDNA 和 gDNA 为模板, 分别使用 Divergent Primer 和 Convergent Primer 扩增 *circSLC8A1*、线性 *SLC8A1* (linear *SLC8A1*) 和 *GAPDH*, 得到的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳。

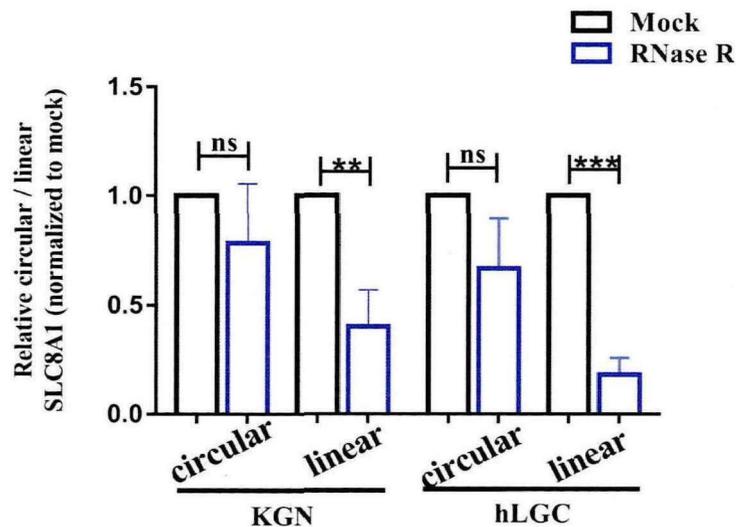


图 2-5 RNase R 处理检测 *circSLC8A1* 的稳定性

Figure 2-5 RNase R treatment tested the stability of *circSLC8A1*

KGN 和 hLGC 用或不用 RNase R 消化，然后进行 qRT-PCR 检测 *circSLC8A1*、linear *SLC8A1* 和 *GAPDH* 的 CT 值，计算其相对表达量。* $P > 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ ，ns：无统计学差异。

4.4 *circSLC8A1* 主要定位于颗粒细胞的细胞质

细胞核/质 RNA 分离结果显示 *circSLC8A1* 在颗粒细胞的细胞核和细胞质中均有分布，但主要定位于细胞质中（图 2-6 A-B），这与 RNA-FISH 的结果相一致（图 2-7 A-B），*18S* 作为细胞浆基因的阳性对照，*pre-GAPDH* 作为细胞核基因的阳性对照，因此说明细胞核/质 RNA 分离和 RNA-FISH 的检测结果可靠。

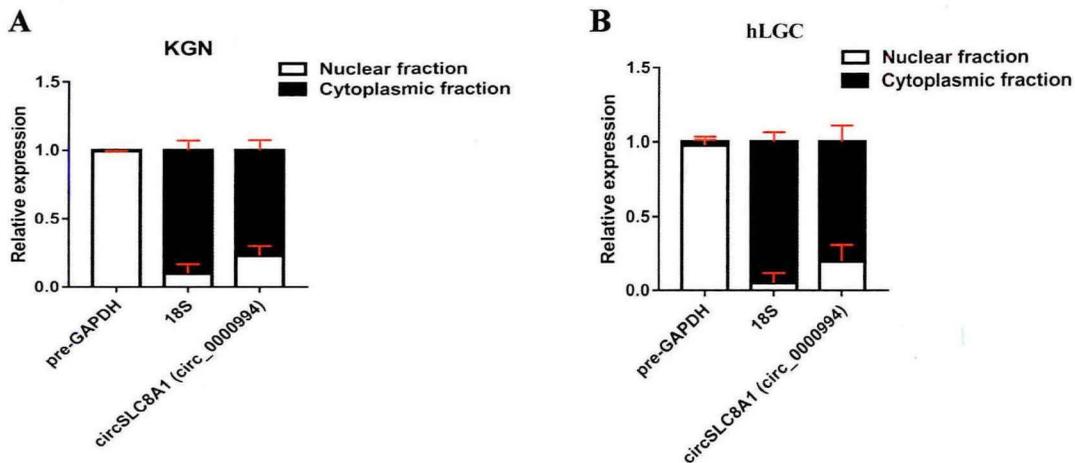


图 2-6 细胞核/质分离技术检测 *circSLC8A1* 在 KGN 和 hLGC 中的定位

Figure 2-6 Localization of *circSLC8A1* in KGN and hLGC was validated by nuclear and cytoplasmic RNA fractionation

(A-B) KGN 和 hLGC 经细胞核/质 RNA 分离，逆转录后进行 qRT-PCR 检测 *circSLC8A1*、*pre-GAPDH* 和 *18S* 在细胞核和细胞质中的表达水平，*pre-GAPDH* 作为细胞核基因表达的阳性对照，*18S* 作为细胞质基因表达的阳性对照。

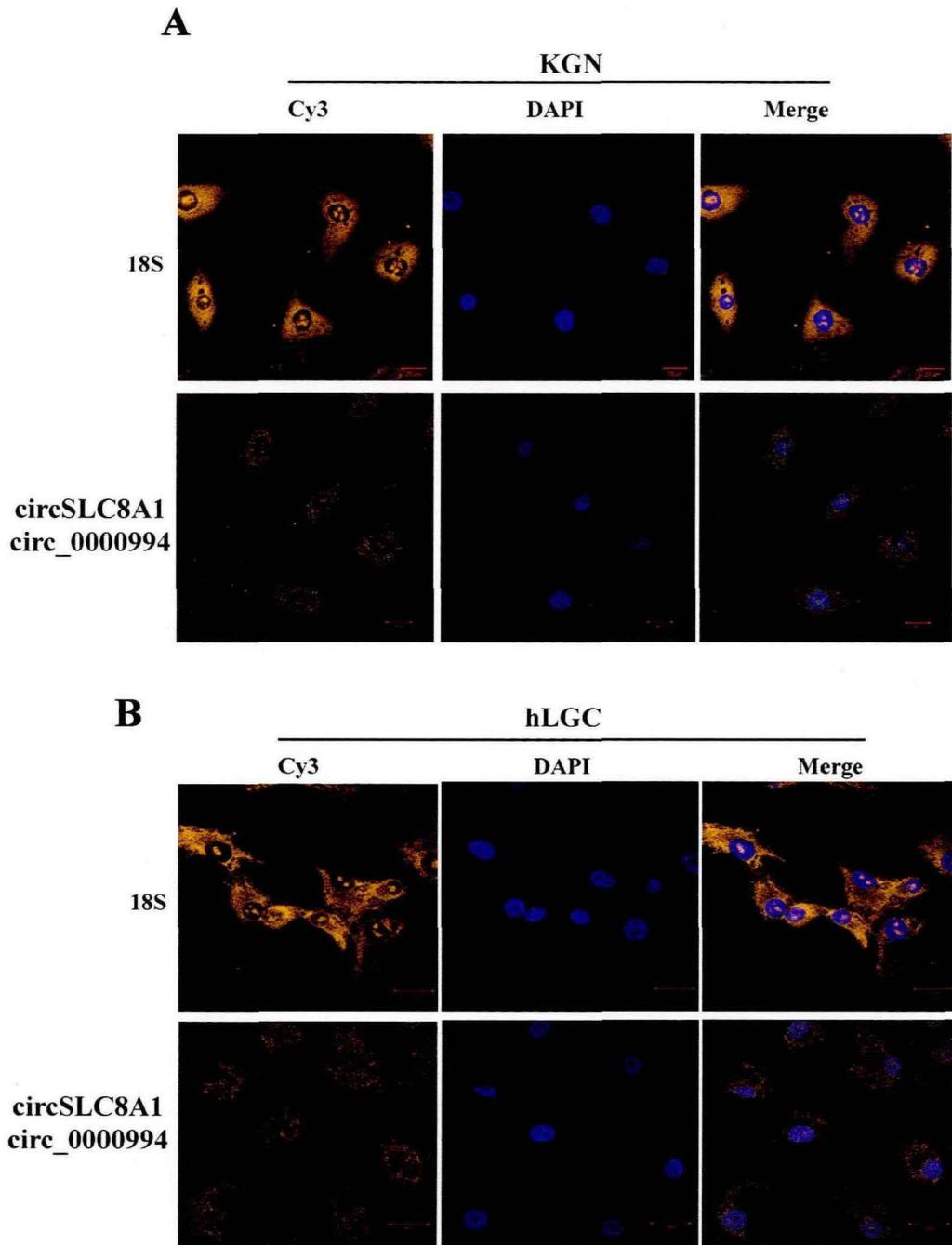


图 2-7 RNA 荧光原位杂交技术检测 *circSLC8A1* 在 KGN 和 hLGC 中的定位

Figure 2-7 Localization of *circSLC8A1* in KGN and hLGC were validated by RNA fluorescence in situ hybridization

(A-B) 在 KGN 和 hLGC 中进行 RNA 荧光原位杂交, 18S 作为细胞质基因的阳性对照。黄色荧光代表 18S 或 *circSLC8A1* 探针, 蓝色荧光代表 DAPI, 标尺: 20 μ m。

4.5 合成的 siRNA 能明显干扰 *circSLC8A1* 的表达

通过上海吉玛公司设计并合成了 2 条干扰 *circSLC8A1* 表达的 siRNA，转染 KGN 和 hLGC 48h 后，qRT-PCR 检测结果显示这 2 条 siRNA 均能明显沉默 *circSLC8A1* 的表达，其中 si_ *circSLC8A1*-1 的敲低效率最高（图 2-8 A-B）。

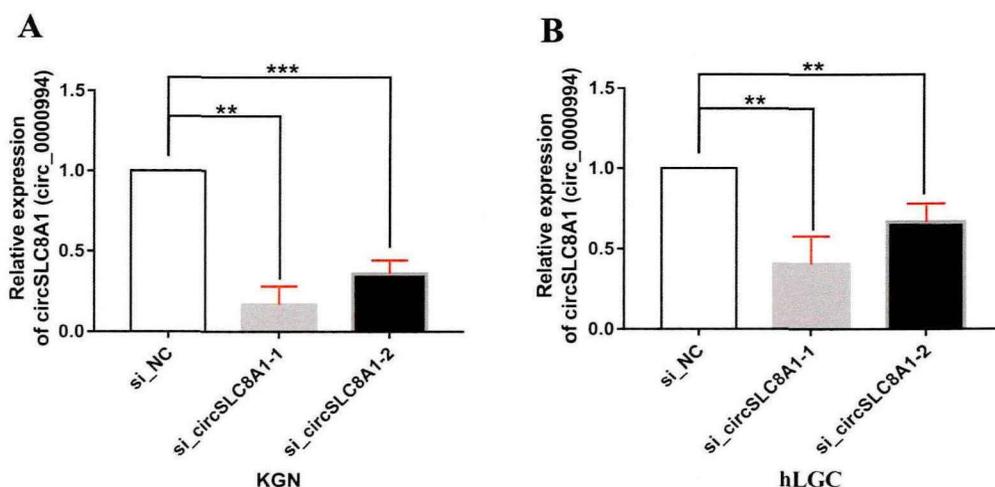


图 2-8 *circSLC8A1* 的 siRNA 干扰效率

Figure 2-8 Interference effect of siRNA in *circSLC8A1*

利用合成的 2 条 siRNA 转染 KGN 和 hLGC 48h 后，进行 qRT-PCR 检测 *circSLC8A1* 的表达水平，*GAPDH* 作为内参。** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ 。

4.6 干扰 *circSLC8A1* 表达抑制了颗粒细胞的增殖

为了探索 *circSLC8A1* 对颗粒细胞增殖的影响，在 KGN 和 hLGC 中，我们利用敲低效率最高的 si_ *circSLC8A1*-1 沉默 *circSLC8A1* 的表达。通过 CCK-8 实验检测了转染 0-72h 后的 OD450 值，发现与对照组相比，沉默 *circSLC8A1* 表达能明显抑制颗粒细胞的增殖功能（图 2-9 A-B）。然后进行 EdU 实验进一步明确沉默 *circSLC8A1* 表达对细胞增殖的影响，结果显示与对照组相比，*circSLC8A1* 下调的颗粒细胞 EdU 阳性率明显降低（图 2-10 A-B），进一步说明沉默 *circSLC8A1* 表达能明显抑制颗粒细胞的增殖功能。

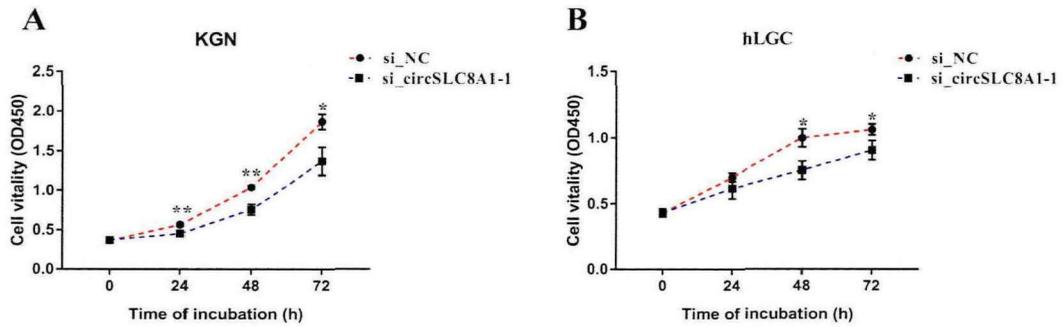


图 2-9 CCK-8 实验检测沉默 *circSLC8A1* 对颗粒细胞增殖的影响

Figure 2-9 Effect of silencing of *circSLC8A1* on the proliferation of granulosa cells was validated by CCK-8 assay

(A-B) 在 KGN 和 hLGC 中干扰 *circSLC8A1* 的表达，分别检测转染 0-72 h 后的 OD450 值。*P < 0.05, **P < 0.01。

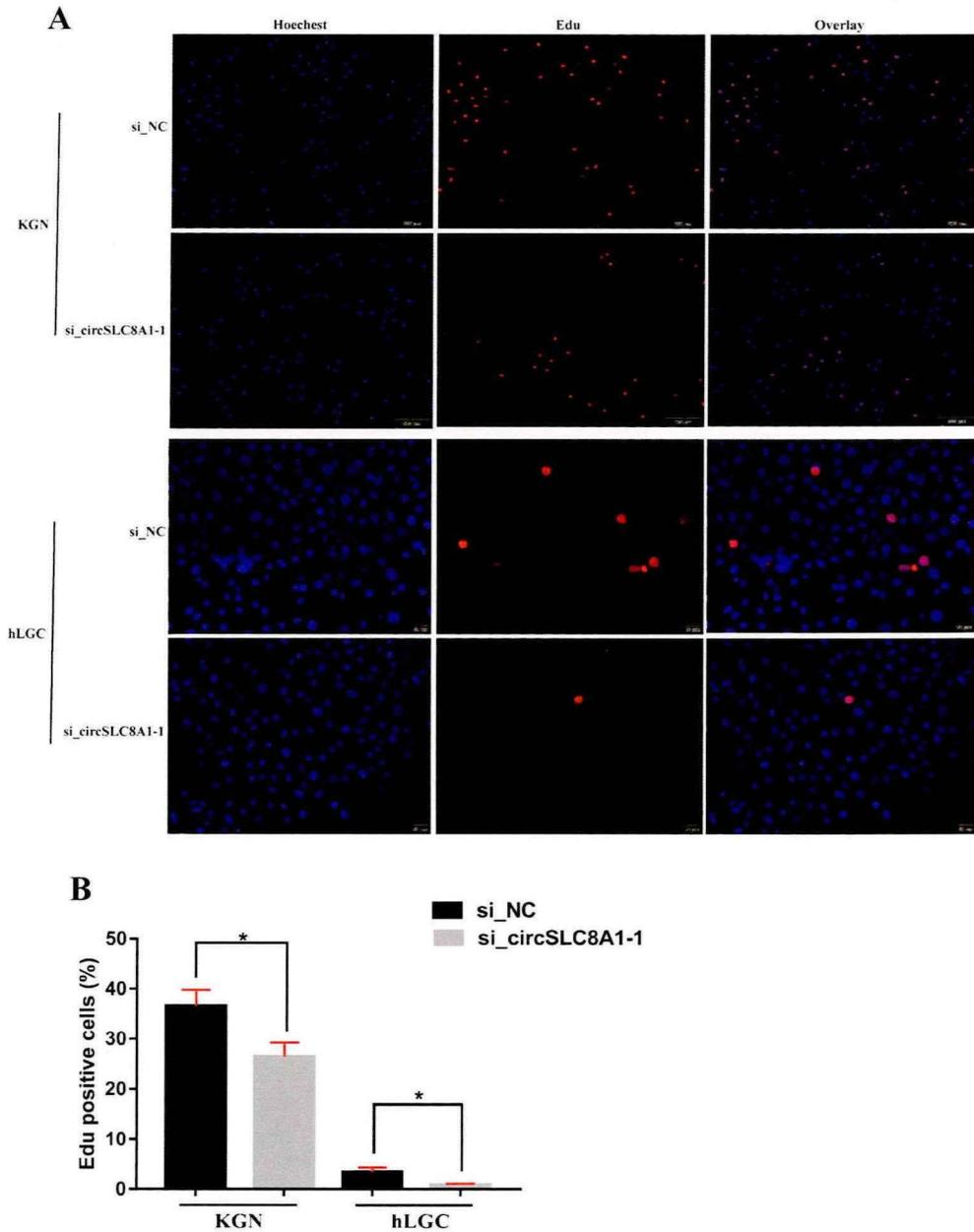


图 2-10 EdU 实验检测沉默 *circSLC8A1* 对颗粒细胞增殖的影响

Figure 2-10 Effect of silencing of *circSLC8A1* on the proliferation of granulosa cells was validated by EdU assay

(A-B) KGN 和 hLGC 按 EdU 试剂盒说明书处理后，在倒置显微镜下观察和拍摄，红色荧光代表 EdU 阳性细胞，蓝色荧光代表细胞核，标尺：20 μ m。然后统计 EdU 阳性细胞的占比。*P < 0.05。

4.7 干扰 *circSLC8A1* 表达促进了颗粒细胞 Bax/Bak/Caspase-9 依赖的凋亡途径

下一步我们探究 *circSLC8A1* 影响颗粒细胞增殖的作用机制，许多研究发现细胞增殖能力下降与细胞凋亡等密切相关。因此，在 KGN 和 hLGC 中，我们利用流式细胞仪检测了 *circSLC8A1* 下调组和对照组颗粒细胞的细胞凋亡情况，结果显示与对照组相比，*circSLC8A1* 下调组的细胞凋亡明显增加（图 2-12 A-B）。此外，Western blot 结果显示在 KGN 和 hLGC 中，沉默 *circSLC8A1* 表达能明显促进细胞凋亡相关蛋白 Bax、Bak 和 Cleaved Caspase-9 的表达（图 2-7 A-B）。以上结果提示沉默 *circSLC8A1* 表达可能促进了颗粒细胞 Bax/Bak/Caspase-9 依赖的凋亡途径，从而导致颗粒细胞增殖缓慢。

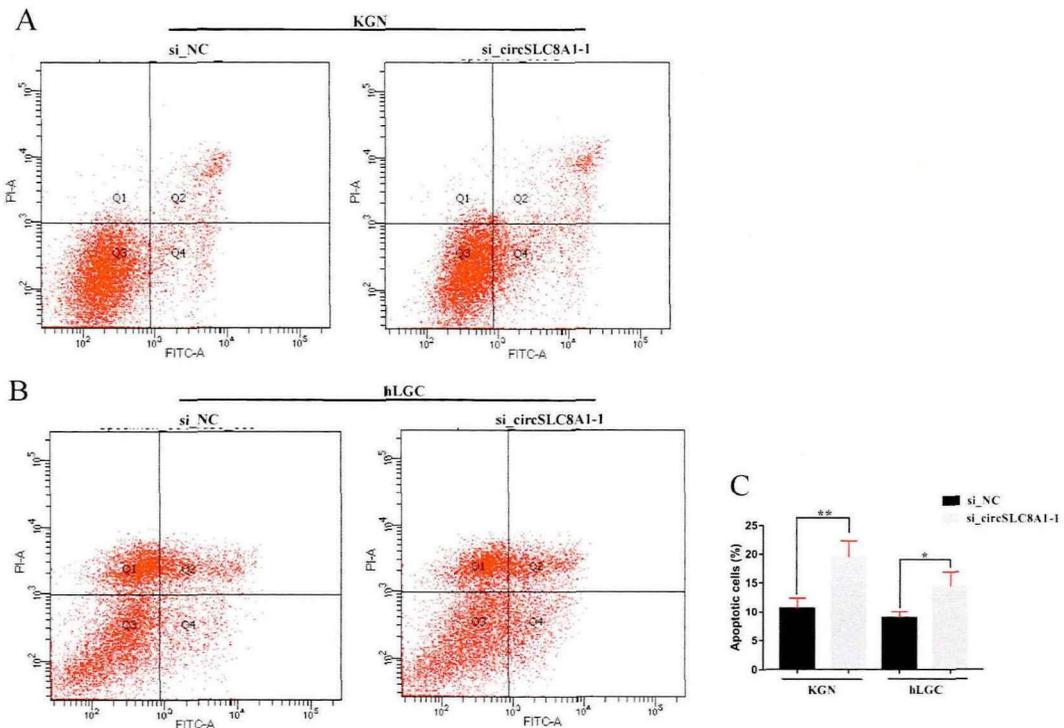


图2-11 干扰*circSLC8A1*表达对细胞凋亡的影响

Figure 2-11 Effects of reduced *circSLC8A1* expression on cell apoptosis

(A-C) 在 KGN 和 hLGC 中，干扰 *circSLC8A1* 表达 48h 后，收集细胞于流式细胞仪中进行细胞凋亡检测，每个样本计数 1 万个细胞左右，然后统计细胞分布在 Q2 和 Q4 区（凋亡细胞）的比例。* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

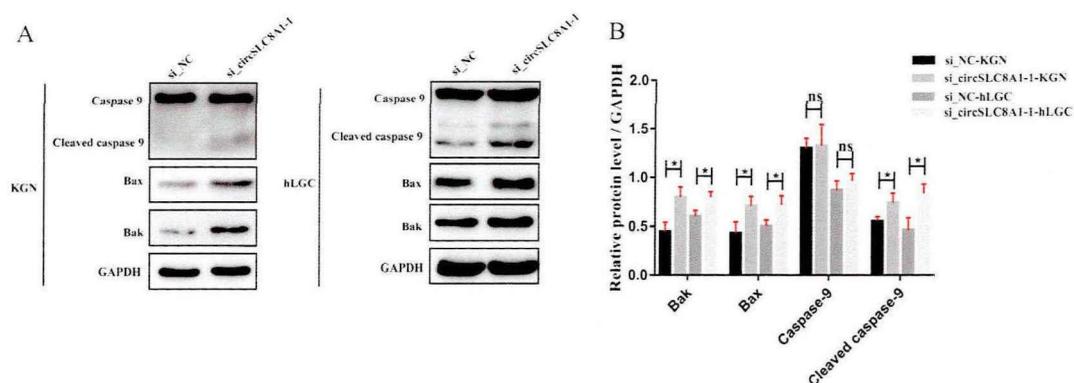


图 2-12 干扰 *circSLC8A1* 促进 Bax/Bak/Caspase-9 依赖的凋亡途径

Figure 2-12 *circSLC8A1* knockdown promotes Bax/Bak/Caspase-9-dependented apoptosis

(A-B) 在 KGN 和 hLGC 中，干扰 *circSLC8A1* 表达 48h 后，收集蛋白进行 Western blot 实验，检测细胞凋亡相关蛋白 Bax、Bak、Caspase-9 和 Cleaved Caspase-9 的表达变化，GAPDH 作为蛋白内参，然后通过 image J 软件进行灰度值分析。* $P < 0.05$ ，ns：无统计学差异。

4.8 干扰 *circSLC8A1* 表达抑制了颗粒细胞芳香化酶基因 *CYP19A1* 和 *FSHR* 基因的表达，从而抑制了 E_2 的生物合成

POI 以月经紊乱、FSH 升高和雌激素波动性下降为特征。*CYP19A1* 是促进雄烯二酮转化为 E_2 的关键酶^[80]。FSHR 在卵泡发育和 E_2 合成中发挥重要作用，是一种 G-蛋白偶联受体（即七次跨膜受体）。因此，接下来我们探索 *circSLC8A1* 是否通过影响激素合成相关基因的表达来影响 E_2 合成，从而导致卵泡生长发育和闭锁异常，推动 POI 的发病进展。

由于用于体外研究的人原代颗粒细胞是从超促排卵治疗后的患者卵泡液中获取的，因此这些颗粒细胞通常已经黄素化，这极大地改变了颗粒细胞的激素合成功能。因此，我们利用了 KGN 细胞系探索 *circSLC8A1* 对非黄素化颗粒细胞激素合成功能的影响，KGN 细胞系被认为具有正常颗粒细胞的大多数生理特征，包括表达功能性的 *FSHR* 和具有芳香化酶活性，因此拥有和正常颗粒细胞类似的类固醇激素合成和分泌功能^[82]。

KGN 细胞经相应处理后，利用电化学发光法检测细胞上清液的 E_2 浓度，

同时收集细胞 RNA 行 qRT-PCR 检测 *FSHR* 和 *CYP19A1* 基因的表达水平。qRT-PCR 结果显示与对照组相比，*circSLC8A1* 下调组中 *CYP19A1* 和 *FSHR* 的表达水平明显下降（图 2-14 A）。电化学发光法的结果显示与对照组相比，*circSLC8A1* 下调组的细胞上清中 E₂ 浓度明显下降（图 2-15 B）。

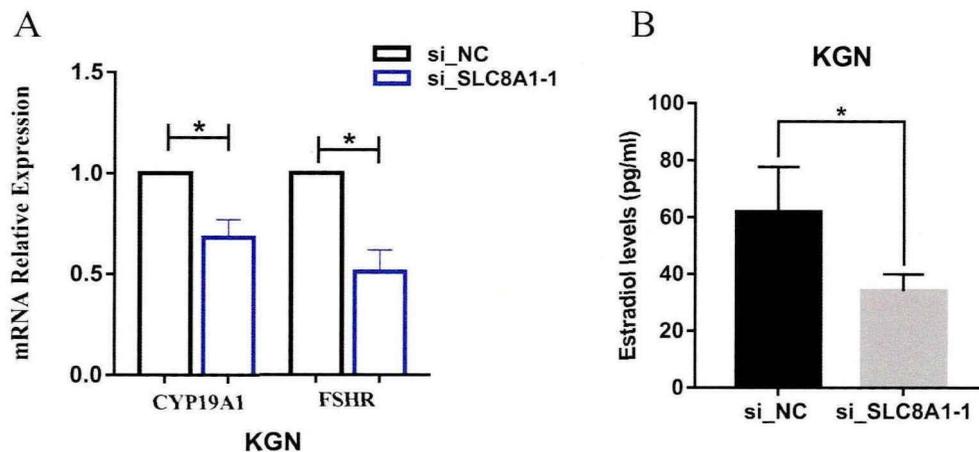


图 2-13 干扰 *circSLC8A1* 表达对芳香化酶基因 (*CYP19A1*) 和 *FSHR* 基因表达以及 E₂ 合成的影响

Figure 2-13 Effects of reduced *circSLC8A1* expression on the expression of aromatase (*CYP19A1*) and *FSHR* gene expression and E₂ biosynthesis

(A-B) 在 KGN 细胞中，沉默 *circSLC8A1* 表达 48h 后，将细胞消化并接种至 12 孔板中，使对照组和实验组的细胞密度一致，然后换含 100nM 雄烯二酮 (Androstenedione) 的无血清 DMEM/F12 培养基，继续培养 24h 后，(A) 收集实验组和对照组细胞 RNA 进行 qRT-PCR 检测 *CYP19A1* 和 *FSH* 受体 (FSH receptor, *FSHR*) 基因的表达水平，*GAPDH* 作为内参。(B) 收集实验组和对照组细胞上清液，利用电化学发光法检测每组 E₂ 的浓度。
**P*<0.05。

4.9 *circSLC8A1* 可能通过调控 cAMP-PKA 信号通路影响颗粒细胞的 E₂ 合成

既往研究发现 FSH 可通过结合颗粒细胞表面的 FSHR 促进细胞内第二信使 cAMP 的合成，进而激活 PKA 信号通路，使颗粒细胞芳香化酶的表达和活性增强，从而促进 E₂ 的合成和分泌^[84]。因此，我们进一步探索了 *circSLC8A1* 是否通过调控 FSH/cAMP/PKA 信号通路影响颗粒细胞 E₂ 的合成。首先，Western

blot 结果显示干扰 *circSLC8A1* 表达能明显降低 PKA 的水平（图 2-15 A-B）。利用 FSH 处理 KGN 细胞，电化学发光法检测结果显示 FSH 能明显促进颗粒细胞的 E₂ 合成，而沉默 *circSLC8A1* 表达能明显拮抗 FSH 诱发的 E₂ 水平升高（图 2-16）。然后，我们利用 cAMP-PKA 通路的激动剂 Forskolin 来处理 KGN 细胞，电化学发光法检测结果显示 Forskolin 能明显促进颗粒细胞的 E₂ 合成，而沉默 *circSLC8A1* 表达能明显拮抗 Forskolin 诱发的 E₂ 水平升高（图 2-17）。以上结果提示 *circSLC8A1* 可能通过调控 FSH/cAMP/PKA 信号通路影响颗粒细胞的 E₂ 合成。

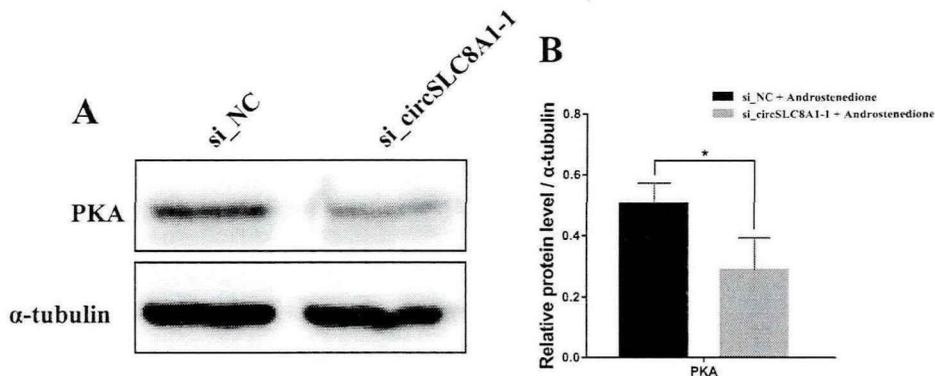


图 2-14 干扰 *circSLC8A1* 表达对 PKA 通路的影响

Figure 2-14 Effects of reduced *circSLC8A1* expression on PKA pathway

在 KGN 细胞中，沉默 *circSLC8A1* 表达 48h 后，收集细胞蛋白行 Western blot 检测 PKA 的蛋白水平， α -tubulin 作为蛋白内参，然后通过 image J 软件进行灰度值分析。
* $P < 0.05$ 。

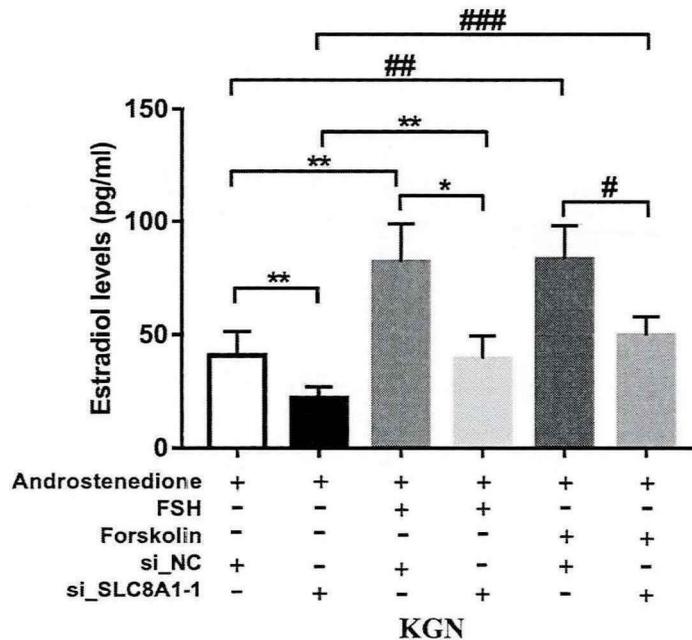


图 2-15 FSH/Forskolin 处理下干扰 *circSLC8A1* 表达对 E₂ 合成的影响

Figure 2-15 Effects of reduced *circSLC8A1* expression on E₂ biosynthesis under the FSH/ Forskolin treatment

在 KGN 细胞中，沉默 *circSLC8A1* 表达 48h 后，将细胞消化并接种至 12 孔板中，使对照组和实验组的细胞密度一致，然后换含 100nM 雄烯二酮的无血清 DMEM/F12 培养基，加入或不加入 0.2IU/mL FSH/10μM Forskolin 继续培养 24h 后，收集实验组和对照组细胞上清液，利用电化学发光法检测每组 E₂ 的浓度。**P*<0.05，***P*<0.01，#*P*<0.05，##*P*<0.01，###*P*<0.001。

4.10 FSH 不影响颗粒细胞 *circSLC8A1* 的表达水平

由于在第一部分研究中，我们发现 *circSLC8A1* 表达水平与患者血清基础 FSH 水平相关。因此，为了排除 FSH 对 *circSLC8A1* 表达的影响，我们利用 rFSH 处理 hLGC 和 KGN 细胞，qRT-PCR 结果显示 FSH 并不影响颗粒细胞中 *circSLC8A1* 的表达水平。

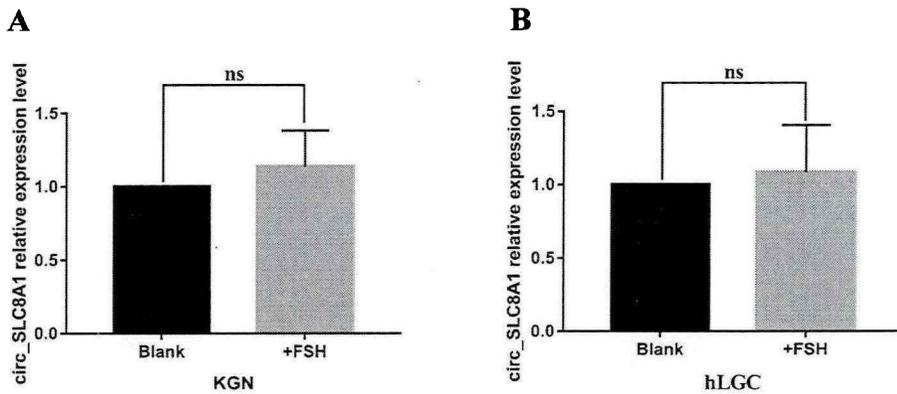


图 2-16 FSH 处理对颗粒细胞 *circSLC8A1* 表达的影响

Figure 2-16 Effects of FSH treatment on *circSLC8A1* expression in granulosa cells

在 hLGC 和 KGN 细胞中，用含重组 FSH (rFSH, 果纳芬, 终浓度 0.2IU/mL) 的无血清 DMEM/F12 培养基培养 48h 后，收集实验组和对照组细胞进行 qRT-PCR 检测 *circSLC8A1* 的表达水平。ns: 无统计学差异。

5 讨论

我们通过体外功能缺失实验研究 *circSLC8A1* 对卵巢颗粒细胞增殖、凋亡及类固醇激素合成功能的影响。首先，我们对 KGN 细胞系和提取的 hLGC 进行培养，并且分离的人原代卵巢颗粒细胞经 FSHR 免疫荧光鉴定，其纯度可达 95% 以上，适合用于体外细胞功能研究。然后，在 KGN 和 hLGC 中，琼脂糖凝胶电泳、Sanger 测序和 Rnase R 处理结果均显示 *circSLC8A1* 是一个闭合环状的 circRNA，并且细胞核/质分离和 FISH 实验均提示 *circSLC8A1* 主要定位于颗粒细胞的细胞质中。根据 *circSLC8A1* 的细胞质定位，我们合成了 2 条 siRNA 对 *circSLC8A1* 的表达进行敲减，qRT-PCR 结果显示合成的 2 条 siRNA 均能沉默 *circSLC8A1* 的表达，其中 si_ *circSLC8A1*-1 的敲低效率最高。因此，我们选择了 si_ *circSLC8A1*-1 沉默 *circSLC8A1* 表达并进行下一步研究。在 KGN 和 hLGC 中，CCK-8 和 EdU 结果均提示沉默 *circSLC8A1* 表达能明显抑制颗粒细胞的增殖。然后通过流式细胞仪和 Western blot 检测沉默 *circSLC8A1* 后对细胞凋亡的影响，结果显示沉默 *circSLC8A1* 表达能明显促进颗粒细胞 Bax/Bak/Caspase-9

依赖的凋亡途径。此外，我们还利用 KGN 细胞研究沉默 *circSLC8A1* 表达对颗粒细胞激素合成的影响，qRT-PCR 结果显示沉默 *circSLC8A1* 能明显抑制芳香化酶基因 *CYP19A1* 和 *FSHR* 的表达，电化学发光法检测结果显示沉默 *circSLC8A1* 表达能明显抑制 E₂ 的合成，并且 *circSLC8A1* 可能是通过调控 FSH/cAMP/PKA 信号通路来影响颗粒细胞的 E₂ 合成。

5.1 *circSLC8A1* 的闭合环状结构与现状

由于 circRNA 具有序列保守性、生物学稳定性和组织特异性，因此被认为是很有前途的生物标志物和治疗靶点，并可能在基因表达调控中发挥潜在作用^[30, 74]。我们前期对 bPOI 患者和对照组患者卵巢颗粒细胞进行了 circRNA 芯片测序，发现了大量差异表达的 circRNA^[9]，为了更好地了解 circRNA 的调控机制，本研究首次关注了在 bPOI 患者卵巢颗粒细胞中下调的 *circSLC8A1* (*circ_0000994*)。 *circSLC8A1* 是由 *SLC8A1* 基因的 1 个外显子经背靠背剪切环化而成，长度为 1832bp。验证环状结构是研究 circRNA 功能的第一步，因此我们使用 Divergent 引物扩增出了预期大小的产物，并通过 Sanger 测序验证了反向剪接位点序列与 circBase 数据库相一致。此外，*circSLC8A1* 能抵抗 RNase R 外切酶的消化，表明其确实为闭合环状结构。在颗粒细胞中，*circSLC8A1* 在细胞核和细胞质中均有分布，但主要位于细胞质中。细胞质丰富的 circRNA 可通过作为 miRNA 分子海绵、蛋白海绵、蛋白支架和蛋白翻译模板等来调控基因表达^[75]。

5.2 *circSLC8A1* 影响颗粒细胞增殖与凋亡的机制研究

既往研究发现 circRNA 在调控卵巢颗粒增殖和凋亡等功能中扮演了重要角色。*circEGFR* 可促进小鼠颗粒细胞 E₂ 的生成和增殖^[85]。*circSLC41A1* 通过竞争性结合 *miR-9820-5p* 促进 SRSF1 抵抗猪颗粒细胞凋亡和滤泡闭锁^[86]。*circ_0023942* 通过调控 CDK-4 抑制人卵巢颗粒细胞的增殖^[87]。*circRNA aplacirc_13267* 通过 *apla-miR-1-13/THBS1* 信号通路促进鸭颗粒细胞的凋亡^[88]。下调的 *ssc-circINHA-001* 通过调控抑制素-激活素平衡促进猪颗粒细胞的凋亡和

卵泡闭锁^[89]。*circ-ANKHD1* 通过调控 *miR-27a-3p/SFRP1* 信号轴促进颗粒细胞增殖和抑制细胞凋亡^[90]。*circDDX10* 通过调节颗粒细胞的增殖和类固醇激素生成与卵巢功能和辅助生殖技术结果相关^[91]。PCOS 颗粒细胞中下调的 *circRNA ciRS-126* 靶向作用于 *miR-21-PDCD4* 轴，抑制颗粒细胞的增殖和促进其凋亡^[92]。*circINHA* 通过上调 *CTGF* 并作为 *miR-10a-5p* 的 ceRNA 在猪卵泡中抵抗颗粒细胞凋亡^[93]。铁细胞凋亡通过 *circRHBG/miR-515/SLC7A11* 信号轴参与 PCOS 颗粒细胞增殖^[94]。*circ_0043532* 通过调控 *miR-182/SGK3* 信号轴促进 PCOS 患者颗粒细胞的增殖和细胞周期进展并抑制其凋亡^[95]。*circ_RANBP9* 通过 *microRNA-136-5p* 促进颗粒细胞增殖和抑制其凋亡^[96]。*circPUM1* 通过吸附 *miR-760* 促进颗粒细胞增殖和抑制其凋亡^[97]。*CircPSMC3* 通过海绵吸收 *miR-296-3p* 调控 PTEN 表达，从而抑制颗粒细胞增殖和促进其凋亡^[98]。下调的 *circ-FURIN* 可通过 *miR-195-5p/BCL2* 信号轴抑制 PCOS 患者颗粒细胞的增殖并诱导其凋亡^[99]。*circRNA* 作为 ceRNA 吸附 miRNA 的研究最多，且多集中于研究 PCOS 患者卵巢颗粒细胞的功能变化，目前暂无 *circSLC8A1* 调控 POI 患者卵巢颗粒细胞功能的相关报道。

因此，为了研究 *circSLC8A1* 对颗粒细胞功能的影响，我们在颗粒细胞中进行了体外缺失实验研究。通过沉默 *circSLC8A1* 的表达，我们发现颗粒细胞的增殖功能明显受到抑制。细胞增殖与细胞凋亡密切相关，因此我们利用流式细胞仪检测了沉默 *circSLC8A1* 表达对颗粒细胞凋亡的影响，结果显示沉默 *circSLC8A1* 表达促进了颗粒细胞凋亡。

细胞凋亡是一个高度保守的过程，在细胞增殖、死亡、内稳态以及生理过程中发挥关键作用。凋亡调控途径的功能障碍会导致多种疾病的发生^[100]。细胞凋亡的启动和执行受到 Bcl-2 和半胱氨酸蛋白酶（Caspase）家族蛋白的调控。Caspase 是一种专门切割天冬氨酸残基的半胱氨酸蛋白酶家族^[101]。Caspase 通常在细胞质中以无活性的酶原形式存在，但凋亡信号一旦被细胞接收到，Caspase 就会立即重新剪切，活化变成含有两个小亚基和两个大亚基的四聚体结构，即活化成 Cleaved Caspase 的形式。活化后的 Caspase 能够降解一系列的蛋白质，

最终导致细胞的死亡。Bcl-2 家族蛋白介导的线粒体途径凋亡被认为是细胞凋亡的主要调控方式，其中 Bax 和 Bak 是线粒体膜通透的主要执行者。细胞外刺激 BH3-only 蛋白与 Bcl-2 家族蛋白结合后，Bak 和 Bax 齐聚并激活，导致线粒体外膜的通透性增加，从而诱导细胞色素 c 等物质的释放^[101-103]，在细胞质中激活 Caspase 级联反应，导致细胞凋亡的发生。在本研究中，沉默 *circSLC8A1* 表达能明显促进 Bax、Bak 和活化 Cleaved Caspase-9 的表达，提示 bPOI 患者卵巢颗粒细胞中下调的 *circSLC8A1* 可能通过活化 Bax/Bak/Caspase-9 级联反应诱导细胞凋亡，进而抑制其增殖功能，导致卵泡生长、发育、闭锁异常，参与了 bPOI 的发生发展。

5.3 *circSLC8A1* 影响颗粒细胞类固醇激素合成的机制研究

FSHR 和 *CYP19A1* 在卵泡生长发育和 E₂ 产生中起到重要作用。*CYP19A1* 是将雄烯二酮转化为 E₂ 的关键芳香化酶。*FSHR* 在颗粒细胞中的表达随着健康卵泡的生长而增加，而在闭锁卵泡中则减少^[78]。*FSH* 主要通过作用于 *FSHR* 诱导 *CYP19A1* 表达，从而增加生长卵泡颗粒细胞产生 E₂。此外，*FSH* 还可以通过结合 *FSHR*，升高细胞内第二信使 cAMP 的水平，进而激活下游 PKA 信号通路，从而促进卵巢颗粒细胞 E₂ 的合成和分泌。E₂ 有助于颗粒细胞增殖和卵泡分化^[104]。卵泡中适当水平的 E₂ 对许多卵巢功能都至关重要，如促进卵泡刺激素活性、诱导黄体生成素受体、抑制细胞凋亡和促进卵泡生长等^[105]。并且卵泡中 E₂ 浓度的差异与窦状卵泡数和个体生育潜能有关。有研究发现颗粒细胞中类固醇生成失调可能会诱导颗粒细胞凋亡和功能障碍，并促进卵泡闭锁，参与 POI 的发病^[51]。*circEGFR*^[85]、*circLDLR*^[81]和 *circDDX10*^[91]等在调控卵巢颗粒细胞激素合成方面发挥着重要作用，但目前暂无 *circSLC8A1* 调控卵巢颗粒细胞激素合成的相关报道。

在本研究中，由于人原代颗粒细胞是从超促排卵治疗后的卵泡液中提取的，因此这些颗粒细胞通常已经黄素化，这极大地改变了颗粒细胞的类固醇激素合成功能。而 KGN 细胞系被认为具有正常颗粒细胞的大多数生理特征，包

括表达功能性的 FSHR 和具有芳香化酶活性, 因此拥有和正常颗粒细胞类似的类固醇激素合成和分泌功能^[82]。故我们利用 KGN 细胞系研究沉默 *circSLC8A1* 表达对颗粒细胞激素合成的影响, 结果显示沉默 *circSLC8A1* 表达能明显降低 *CYP19A1* 和 *FSHR* 的表达水平, 进而降低细胞上清液 E₂ 的浓度。然后, 我们利用 FSH 以及 cAMP-PKA 通路激动剂 Forskolin 处理 KGN 细胞, 进一步发现 *circSLC8A1* 可能通过调控 FSH/cAMP/PKA 信号通路来影响卵巢颗粒细胞 E₂ 的合成。我们的研究提示 bPOI 患者卵巢颗粒细胞中下调的 *circSLC8A1* 可能通过抑制 *CYP19A1* 和 *FSHR* 表达以及 FSH/cAMP/PKA 信号通路降低卵巢颗粒细胞的 E₂ 合成, 进而影响了颗粒细胞的增殖和凋亡, 最终导致卵泡生长发育、闭锁异常, 推动了 bPOI 及其相关不孕症的发生发展。

6 小结

circSLC8A1(*circ_0000994*)是由 *SLC8A1* 的 1 号外显子反向剪接而成, 呈闭合环状结构, 在细胞核和细胞质中均有表达, 但主要定位于细胞质中。沉默 *circSLC8A1* 表达能明显抑制颗粒细胞的增殖, 并激活 Bax/Bak/Caspase-9 依赖的细胞凋亡途径。此外, 沉默 *circSLC8A1* 表达能明显降低芳香化酶基因 *CYP19A1* 和 *FSHR* 的表达水平, 并抑制 FSH/cAMP/PKA 信号通路, 导致颗粒细胞 E₂ 的合成减少。*circSLC8A1* 可能通过影响颗粒细胞的增殖、凋亡以及类固醇激素合成功能, 导致卵泡的生长发育、闭锁异常, 参与 bPOI 及其相关不孕症的发生发展。

第三章 环状 RNA circSLC8A1 对卵巢颗粒细胞自噬的影响及其作用机制

1 前言

自噬是一种在真核生物进化过程中高度保守的分解代谢过程，通过降解细胞蛋白质和细胞器等维持细胞内稳态^[106, 107]。自噬的形式可以划分为巨自噬、分子伴侣介导的自噬和微自噬，其中巨自噬被认为是细胞内最主要的自噬形式。而在本研究中，我们研究的自噬均为巨自噬。自噬的过程主要包括：首先形成具有双层膜结构的空泡，双膜吞噬泡在自噬相关（Autophagy-related, ATG）蛋白的协同作用下，包裹变性坏死的细胞质及受损细胞器并传递至溶酶体，融合形成自噬溶酶体，然后捕获的细胞物质最终被溶酶体蛋白酶降解，这个动态的过程被称为自噬流。

在自噬开始前，LC3（Light Chain 3, LC3）前体（pro-LC3）会首先在其羧基端被 Atg4 剪切形成胞浆可溶形式的 LC3-I。自噬开始后，LC3-I 会在类 E1 样酶 Atg7、类 E2 样酶 Atg3 和类 E3 样酶 Atg5-Atg12-Atg16L 复合物的协同作用下，与自噬体膜表面的磷脂酰乙醇胺结合生成 LC3-II，这是激活自噬小体形成的关键。腔内 LC3-II 随后会被自噬体和溶酶体的结合降解，形成自噬溶酶体。因此，LC3-II 是自噬体的重要标志分子，并且其表达水平与自噬体数量密切相关^[108]。另一种广泛使用的自噬标志物是 p62，也被称为 SQSTM1，是一种重要的选择性自噬接头蛋白。p62 主要通过 UBA 结构域和 LIR 结构域的磷酸化等与 LC3/Atg8 和泛素化蛋白连接，最终进入溶酶体降解^[109]。因此，p62 水平降低通常被认为是自噬活性增强的标志。

自噬一方面可以降解有害或多余的细胞成分，包括胞浆和核物质^[110]，另一方面，自噬降解的物质可以重复利用，进行细胞和组织的重塑。自噬是一个被严格调控的过程，在各种生理和病理条件下发挥重要作用。因此，自噬失调与各种类型的人类疾病有关^[111]，包括癌症^[112]、神经退行性疾病^[113]、心血管疾病

[114]、自身免疫性疾病^[115]和代谢性疾病^[116]等，在这些病理状态下自噬通常表现出双向趋势，即自噬缺陷或过度激活^[117]。

在小鼠的卵巢中，自噬参与维持卵母细胞与颗粒细胞的存活^[118]，并且和细胞凋亡一起介导了卵泡的闭锁^[119]。人脐带来源的间充质干细胞移植能够抑制卵巢泡膜-间质细胞的自噬来减少细胞凋亡，从而恢复 POI 大鼠卵巢功能^[54]。有研究发现顺铂构建的 POI 小鼠模型中，卵巢颗粒细胞的自噬和凋亡增加^[53]。小鼠生殖细胞特异性敲除 *Atg7* 诱发自噬缺陷后，卵泡和卵母细胞的数量显著减少，导致 POI 的发生^[120]。有研究团队对 POI 患者进行全外显子测序发现存在 *Atg7* 和 *Atg9A* 变异，进一步研究发现 *Atg7* 和 *Atg9A* 功能缺失变异可触发自噬损伤和卵巢功能衰竭^[121, 122]。这些研究表明自噬是把双刃剑，既能促进生殖细胞存活也会导致生殖细胞凋亡，与 POI 的发生密切相关，但其具体机制仍有待研究。阐明 *circSLC8A1* 在颗粒细胞自噬方面的作用机制，对于深入研究 bPOI 的调控机制、寻找治疗 bPOI 的有效措施具有重要意义。

2 实验材料

2.1 实验细胞

2.1.1 人原代卵巢颗粒细胞：

本研究所使用的人卵巢黄素化颗粒细胞（Human Luteinized Granulosa Cell, hLGC）均来源于生殖医学中心接受 IVF/ICSI-ET 治疗的患者。患者的纳入标准如下：

①患者年龄范围为 25-30 岁，BMI 在 18-24kg/m² 之间；②患者既往月经规律，月经周期 24-35 天；③患者因单纯输卵管因素和/或男方因素接受 IVF/ICSI-ET 治疗；④患者第 2-4 天测血清基础 FSH < 10IU/L、LH < 10mIU/mL 及 E₂ < 50pg/mL；⑤取卵周期中获卵数 ≥ 4 个。

2.1.2 人卵巢颗粒细胞系：

人卵巢颗粒细胞系——KGN，由山东大学秦莹莹教授慷慨赠予，来源于日本 RIKEN BioResource Center。KGN 细胞系被认为具有正常颗粒细胞的大多数

生理特征, 包括表达功能性的 FSHR 和具有芳香化酶活性, 以及与正常颗粒细胞中观察到的相同的甾体发生和 fas 介导的凋亡模式。因此, KGN 细胞系被认为是了解人类卵巢颗粒细胞中类固醇发生、细胞生长和凋亡调控的有用模型 [82]。

2.2 仪器设备与耗材

实验仪器和耗材一览表

List of the used laboratory apparatuses and consumable

仪器名称	生产厂家
台式低温离心机	美国 Thermo 公司
水平低温离心机	美国 Thermo 公司
超净工作台	新加坡 ESCO 公司
全外排生物安全柜	新加坡 ESCO 公司
高压灭菌器	日本 Hirayama 公司
漩涡震荡仪	中国江苏麒麟医用仪器厂
制冰机	中国宁波格兰特公司
超微量分光光度计	美国 Thermo 公司
- 80℃超低温冰箱	日本 SANYO 公司
低温冰箱	中国海尔公司
微量移液枪	德国 Eppendorf 公司
无 RNase 移液器吸头	美国 Kirgen 公司
无 RNase 无菌离心管	美国 Axygen 公司
无菌巴氏吸管	美国巴罗克公司
滤菌器 (孔径 0.22μm)	美国 Millipore 公司
水平摇床	中国海门其林贝尔公司
垂直板电泳仪与转印系统	美国 Bio-Rad 公司
电子分析天平	中国上海梅特勒-托利公司
转印滤纸 Bio-Rad 公司	美国 Bio-Rad 公司
PVDF 膜	美国 Millipore 公司
化学发光分析仪	中国上海天能公司

激光共聚焦扫描显微镜	德国 ZEISS 公司
细胞恒温培养箱	美国 Thermo 公司
电热恒温水浴箱	中国上海一恒科技公司
细胞计数板	美国 Thermo Fisher 公司
细胞培养板 (96 孔、24 孔、12 孔、6 孔)	美国 Corning 公司
共聚焦培养皿	美国 Corning 公司
细胞培养瓶	美国 Corning 公司
细胞培养皿 (大、中、小)	美国 Corning 公司
细胞冻存管	美国 Corning 公司
梯度降温冻存盒	美国 Thermo 公司
细胞刮刀	美国巴罗克公司
载玻片和盖玻片	中国江苏世泰公司
全自动电化学发光免疫分析仪	美国罗氏公司

2.3 主要使用实验试剂

实验试剂一览表

List of the used experiment reagents

试剂名称	生产厂家
1×PBS 缓冲液	美国 HyClone 公司
10×PBS 缓冲液	中国北京雷根公司
红细胞裂解液	美国 Sigma-Alorich 公司
Percoll 细胞分离原液	美国 Sigma-Alorich 公司
无 RNase 水	中国广东广州锐博公司
DMEM/F12 培养基	美国 Gibco 公司
Lipofectamine RNAi MAX	美国 Invitrogen 公司
RFect ^{PM} siRNA 原代细胞小核酸转染试剂	中国常州百代科技股份有限公司
Opti-MEM 溶液	美国 Invitrogen 公司
siRNA	中国广东广州锐博公司
FBS	美国 Gibco 公司

0.25%含 EDTA 的胰酶和不含 EDTA 的胰酶	美国 HyClone 公司
二甲基亚砷 (Dimethyl Sulfoxide , DMSO)	美国 Sigma 公司
细胞凋亡检测试剂盒	中国上海贝博公司
100× BIOMYC-3	中国杭州弗德生物科技有限公司
青霉素、链霉素双抗	中国杭州弗德生物科技有限公司
RIPA 裂解液	中国上海碧云天公司
PMSF 蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂	中国上海碧云天公司
BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型)	中国上海碧云天公司
5×Loading buffer	中国北京雷根公司
过硫酸铵	中国上海碧云天公司
30% Acr-Bis 溶液	中国合肥 Biosharp 公司
1.5M Tris HCL pH 8.8	中国北京雷根公司
1M Tris HCL pH 6.8	中国北京雷根公司
10% SDS 溶液	中国北京雷根公司
TEMED	中国上海碧云天公司
甘氨酸	德国 Biofroxx 公司
Tris-base	德国 Biofroxx 公司
十二烷基硫酸钠 (SDS)	中国北京雷根公司
牛血清白蛋白 (BSA) 粉末	中国上海碧云天公司
预染蛋白 Marker	美国 Thermo 公司
一抗稀释液	中国上海碧云天公司
ECL 发光液	美国 Bio-Rad 公司
HRP 标记山羊抗兔二抗	美国 Abcam 公司
HRP 标记山羊抗小鼠二抗	美国 Cell Signaling Technology 公司
RFP-GFP-LC3 腺病毒	中国上海吉凯公司
小鼠抗人 p62 抗体	美国 Abcam 公司
兔抗人 LC3B I/II 抗体	美国 Bimake 公司
兔抗人 ERK 抗体	美国 Cell Signaling Technology 公司
兔抗人 p-ERK 抗体	美国 Cell Signaling Technology 公司

兔抗人 p38 MAPK 抗体	美国 Cell Signaling Technology 公司
兔抗人 p-p38 MAPK 抗体	美国 Cell Signaling Technology 公司
兔抗人 JNK 抗体	美国 Cell Signaling Technology 公司
兔抗人 p-JNK 抗体	美国 Cell Signaling Technology 公司
兔抗人 c-Jun 抗体	美国 Cell Signaling Technology 公司
兔抗人 p-c-Jun 抗体	美国 Cell Signaling Technology 公司
小鼠抗人 β -actin 抗体	中国武汉 Proteintech 公司
兔抗人 P21 抗体	美国 Cell Signaling Technology 公司
氯喹 (Chloroquine, CQ)	美国 Sigma 公司
SP600125	美国 Selleck&bimake 公司
小鼠抗人 GAPDH	中国武汉 Proteintech 公司
TBS 粉末	中国上海双螺旋生物科技公司
4%多聚甲醛	中国北京雷根公司
透明质酸酶	美国 Worthington 公司

2.4 主要使用试剂的配置方法

同第二部分。

3 研究方法

部分研究方法同第二部分。

3.1 利用 RFP-GFP-LC3 腺病毒观察自噬流

(1) RFP-GFP-LC3 腺病毒由上海吉凯公司设计并合成，放置于 -80°C 保存。

(2) 首先进行预实验，RFP-GFP-LC3 腺病毒于冰上融解，然后以 0、10、20、30、50、100 的感染复数 (Multiplicity of Infection, MOI) 梯度转染至颗粒细胞，于培养箱中培养 8 h 后，更换不含病毒的培养基继续培养；

(3) 预实验结果显示当 MOI 为 10 时，颗粒细胞状态良好，且转染效率高，因此选定 10 MOI 值的 RFP-GFP-LC3 腺病毒进行转染；

(4) 接种适量密度的 KGN 和 hLGC 于共聚焦皿中，于培养箱中培养过夜，待细胞密度达到 50% 左右时，加入 10 MOI 值的 RFP-GFP-LC3 腺病毒，于培养箱

中培养 8h 后，更换不含病毒的培养基，并对细胞进行相应处理；

(5) 细胞处理 48h 后，弃旧培，用移液枪吸取适量的 1×PBS 溶液清洗细胞 2 次，5min/次；

(6) 将 PBS 液吸弃，然后加入 4% 的多聚甲醛溶液 500 μ L，在室温条件下，固定 15min 左右；

(7) 将固定液吸弃，用移液枪吸取适量的 1×PBS 溶液清洗细胞 2 次，每次 5min；

(8) 弃 PBS 液，避光，每皿滴入几滴含 DAPI 的抗荧光猝灭封片剂，孵育 15min 左右；

(9) 避光，采用共聚焦显微镜观察和拍摄自噬流。

3.2 透射电镜观察自噬体的数量

(1) 将适量 KGN 细胞接种于大皿，于培养箱内培养过夜，次日待细胞密度达到 40% 左右时转染 *circSLC8A1* 的 siRNA 和对照，于培养箱内继续培养 48h；

(2) 弃液，用 1×PBS 清洗 2 次，然后加入胰酶消化 2min 左右，立即加入含 10% FBS 的培养基中和消化，用移液枪轻轻吹打细胞，然后将细胞悬液转移至离心管中，4 $^{\circ}$ C 离心，2000rpm \times 2min，细胞沉淀要有绿豆大小；

(3) 弃上清，沿着管壁轻轻加入 2.5% 的常温戊二醇固定液，注意不要吹散细胞沉淀；

(4) 用针头轻轻挑起细胞沉淀，使其悬浮于固定液中，避光于室温固定 30min，然后转移至 4 $^{\circ}$ C 保存；

(5) 固定好的标本用 4 $^{\circ}$ C 冰袋运送至广州塞维尔生物有限公司，对自噬小体和自噬溶酶体数量进行观察和拍摄。

3.3 统计学分析

本研究主要采用 SPSS 16.0 或 GraphPad Prism 5 软件对实验结果进行统计学分析。利用 Student's t 检验比较两组间计量资料有无统计学差异，所有分析数

据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm SD$) 表示, 设双侧检验, $P < 0.05$ 被认为差异有统计学意义。

4 实验结果

4.1 沉默 *circSLC8A1* 能增强颗粒细胞的自噬活性

在 KGN 细胞中, 通过透射电镜观察发现, 与对照组相比, *circSLC8A1* 下调组的自噬溶酶体数量明显增加 (图 3-1 A)。由于 LC3-II 水平与自噬体数量相关^[108], 并且 LC3-II 在 Western blot 实验中的敏感性远高于 LC3-I^[123], 因此本研究使用 LC3-II/内参蛋白比较各组 LC3-II 水平, 评估其自噬活性。在 KGN 和 hLGC 中, Western blot 结果显示, 沉默 *circSLC8A1* 表达能明显升高 LC3B-II、Atg3、Atg5、Atg7、Atg12-Atg5 和 Atg16L1 的水平, 并降低 p62 水平 (图 3-2 A-B)。此外, 通过转染双荧光 RFP-GFP-LC3 腺病毒可以观察自噬流的变化。mRFP 和 GFP 荧光用于标记及追踪 LC3, 其中 GFP 绿色荧光蛋白对酸性十分敏感, 自噬体与溶酶体融合时, 溶酶体内的酸性环境会引起 GFP 绿色荧光的淬灭, 此时在共聚焦显微镜下只能观察到 mRFP 红色荧光。因此 mRFP 红色荧光和 GFP 绿色荧光 Merge 后的黄色荧光指示自噬体, mRFP 红色荧光的增多或者 GFP 绿色荧光的减少指示自噬体已与溶酶体结合, 即促进自噬流。如图 3-3 所示, 在 KGN 和 hLGC 中, 与对照组相比, 沉默 *circSLC8A1* 表达可明显增加自噬体的数量 (黄色斑点增多) 并增强自噬流 (红色斑点增多)。以上结果提示沉默 *circSLC8A1* 表达能明显增强颗粒细胞的自噬活性。

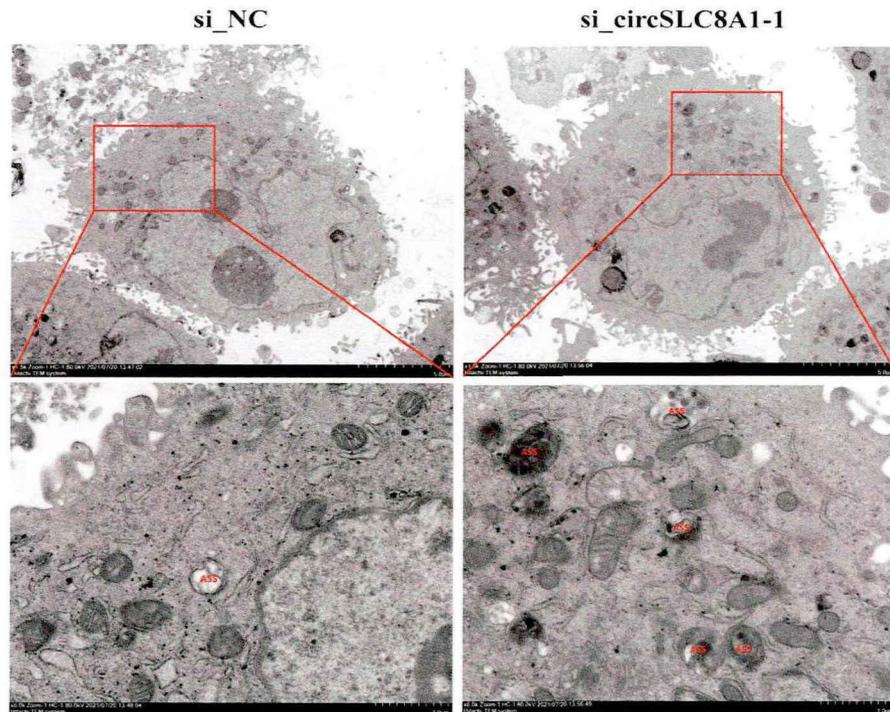


图 3-1 透射电镜观察干扰 *circSLC8A1* 表达对颗粒细胞自噬体和自噬溶酶体形成的影响

Figure 3-1 Effects of reduced *circSLC8A1* expression on the formation of autophagosomes and autophagolysosomes were observed by Transmission Electron Microscopy

在 KGN 细胞中, 沉默 *circSLC8A1* 表达 48h 后, 收集实验组和对照组细胞, 利用透射电镜对细胞内自噬体和自噬溶酶体数量进行观察并拍摄。ASS: 自噬溶酶体, 标尺: 2 μ m/格。

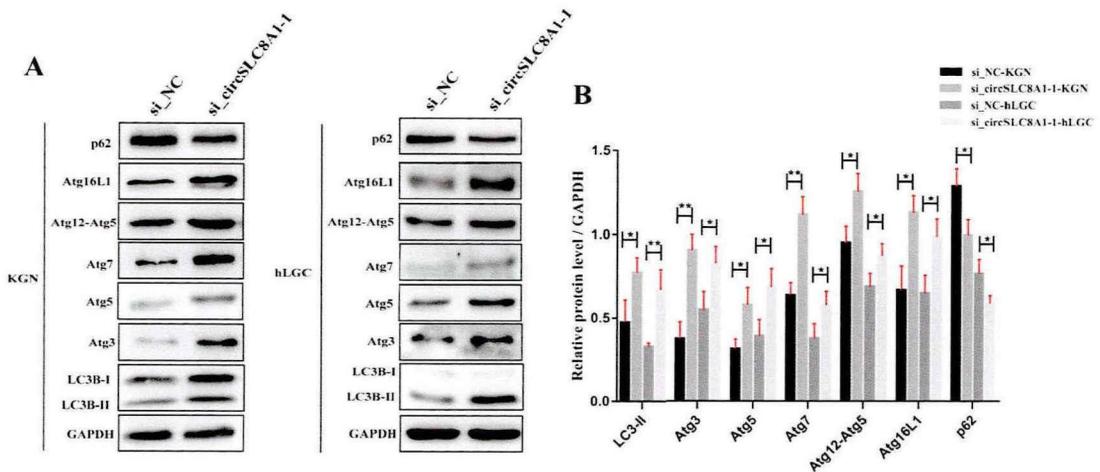


图 3-2 Western blot 检测干扰 *circSLC8A1* 表达对颗粒细胞自噬相关蛋白的影响

Figure 3-2 Effects of reduced *circSLC8A1* expression on autophagy-related proteins were verified by Western blot

(A-B) 在 hLGC 和 KGN 细胞中, 进行 Western blot 分析, 检测 LC3B、Atg3、Atg5、Atg7、Atg12-Atg5、Atg16L1 和 p62 的表达水平, GAPDH 作为内参, 然后利用 image J 对蛋白条带的灰度值进行比较。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

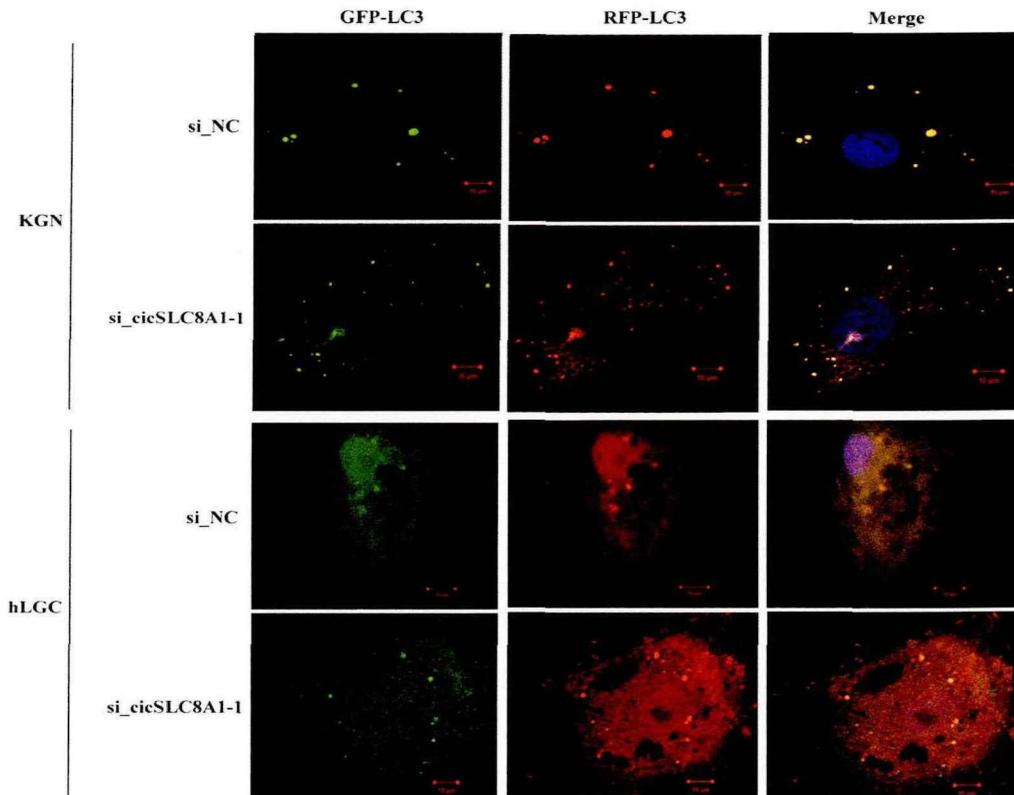


图 3-3 共聚焦显微镜观察干扰 *circSLC8A1* 表达对颗粒细胞自噬流的影响

Figure 3-3 Effects of reduced *circSLC8A1* expression on autophagy flux in granulosa cells were observed by Confocal Microscopy

在 KGN 和 hLGC 中, 转染 RFP-GFP-LC3 腺病毒后, 沉默 *circSLC8A1* 表达 48h 后, 采用共聚焦显微镜进行观察并拍摄。绿色荧光: GFP-LC3, 红色荧光: RFP-LC3, 红绿荧光 Merge 后黄色荧光: 自噬体, 蓝色荧光: DAPI, 标尺: 10 μ m。

4.2 氯喹处理下沉默 *circSLC8A1* 仍能增强颗粒细胞的自噬活性

为了更好地评估自噬体的生物合成情况, 须在溶酶体功能抑制剂存在的情况下分析 LC3B-II 水平, 如氯喹 (Chloroquine, CQ)。CQ 是一种溶酶体亲和剂, 通过提高溶酶体内的 pH 值而阻碍自噬体与其结合, 导致自噬体的堆积,

因此通常作为自噬流的抑制剂进行实验研究。Western blot 结果显示, 在 KGN 和 hLGC 中, CQ 处理组细胞的 LC3B-II 和 p62 水平明显升高, 提示 CQ 可以明显阻断自噬体与溶酶体的结合, 导致颗粒细胞中 LC3B-II 和 p62 的累积。而在 CQ 的处理下, 与对照组相比, 沉默 *circSLC8A1* 表达可以进一步升高 LC3B-II 的水平, 并降低 p62 的水平 (图 3-4 A-B), 提示沉默 *circSLC8A1* 表达引起的 LC3B-II 水平升高, 是由于其促进了 LC3B-II 的合成所致, 而不是自噬流阻断导致的。此外, 如图 3-5 所示, 在 KGN 和 hLGC 中, CQ 处理组细胞的自噬体数量明显增加 (黄色斑点增多), 提示 CQ 能阻断颗粒细胞中自噬体和溶酶体的结合, 导致自噬体堆积。而在 CQ 的处理下, 与对照组相比, 沉默 *circSLC8A1* 表达仍能增加自噬体的数量 (黄色斑点增多) 并增强自噬流 (红色斑点增多)。以上结果进一步提示沉默 *circSLC8A1* 表达能明显增强颗粒细胞的自噬活性。

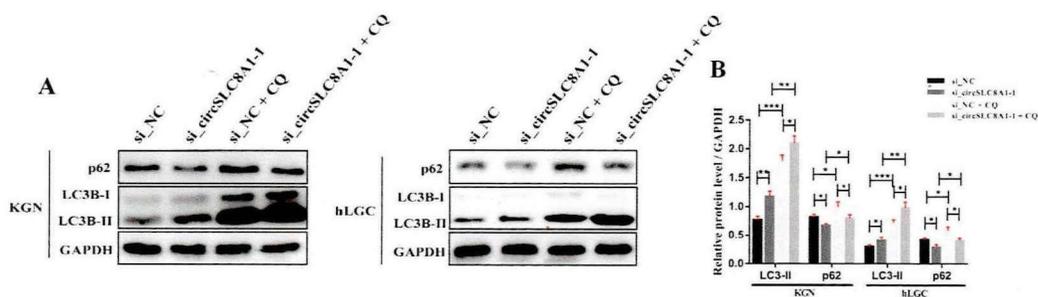


图 3-4 Western blot 检测氯喹处理下干扰 *circSLC8A1* 表达对自噬相关蛋白的影响

Figure 3-4 Effects of reduced *circSLC8A1* expression on autophagy-related proteins under the treatment of chloroquine were verified by Western blot

(A-B) 在 KGN 和 hLGC 中, 沉默 *circSLC8A1* 表达 48h 后, 加入或不加入 20 μ M 氯喹 (chloroquine, CQ) 处理 6-8h, 收集实验组和对照组细胞蛋白进行 Western blot 检测 LC3B 和 p62 的表达水平, GAPDH 作为内参, 然后利用 image J 对蛋白条带的灰度值进行比较。
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

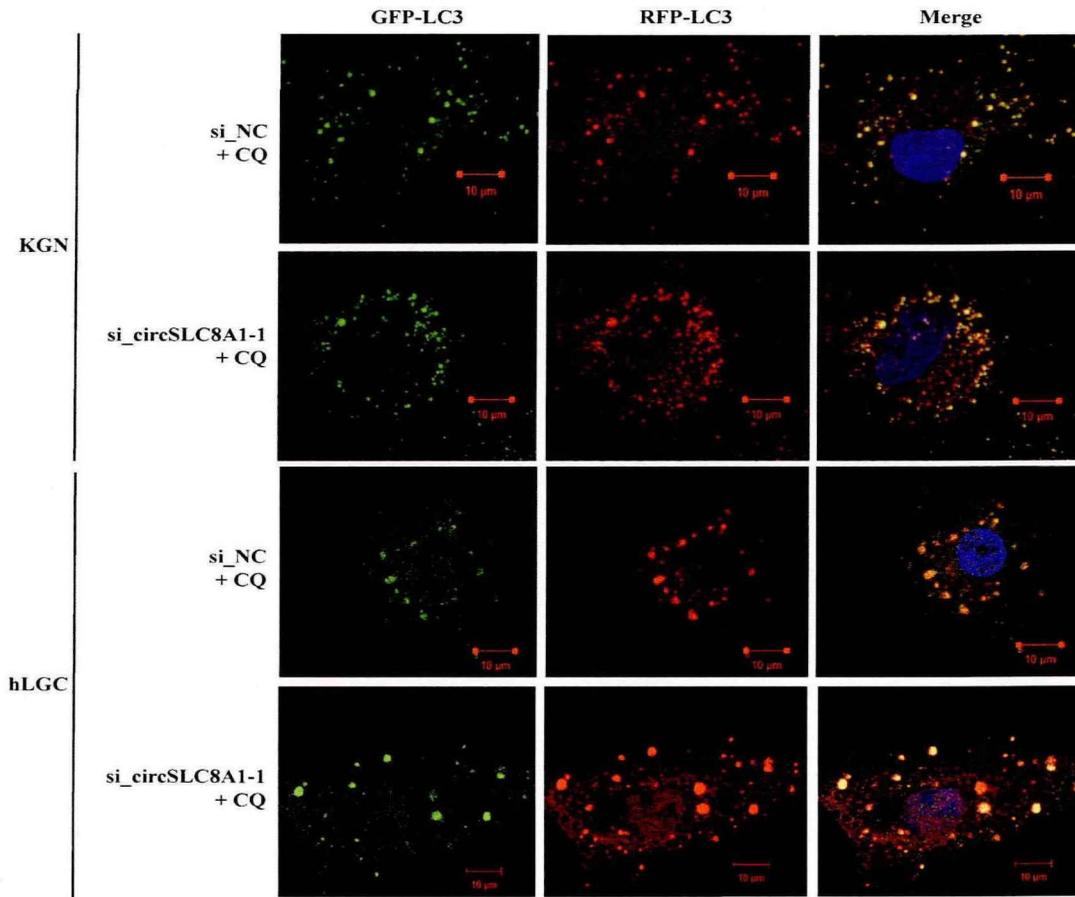


图 3-5 共聚焦显微镜观察 CQ 处理下干扰 *circSLC8A1* 表达对自噬流的影响

Figure 3-5 Effects of reduced *circSLC8A1* expression on autophagy flux under the treatment of CQ were observed by Confocal Microscopy

在 KGN 和 hLGC 中，转染 RFP-GFP-LC3 腺病毒后，沉默 *circSLC8A1* 表达 48h 后，加入或不加入 20 μ M CQ 处理 6-8h，然后采用共聚焦显微镜进行观察并拍摄。绿色荧光：GFP-LC3，红色荧光：RFP-LC3，红绿荧光 Merge 后的黄色荧光：自噬体，蓝色荧光：DAPI，标尺：10 μ m。

4.3 沉默 *circSLC8A1* 表达并不影响 PI3K/AKT/mTOR 信号通路

既往许多研究发现 PI3K/AKT/mTOR 信号通路在调控细胞自噬中发挥了重要作用^[124-126]。因此，我们通过 Western blot 检测沉默 *circSLC8A1* 表达后对 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的影响，结果显示在 KGN 和 hLGC 中，敲低

circSLC8A1 并不影响 PI3K、AKT、p-AKT 和 p-mTOR 的蛋白水平，提示 *circSLC8A1* 可能不是通过调控 PI3K/AKT/mTOR 信号通路来影响颗粒细胞的自噬（图 3-6）。那么 *circSLC8A1* 通过调控何种信号通路来影响颗粒细胞的自噬活性呢？

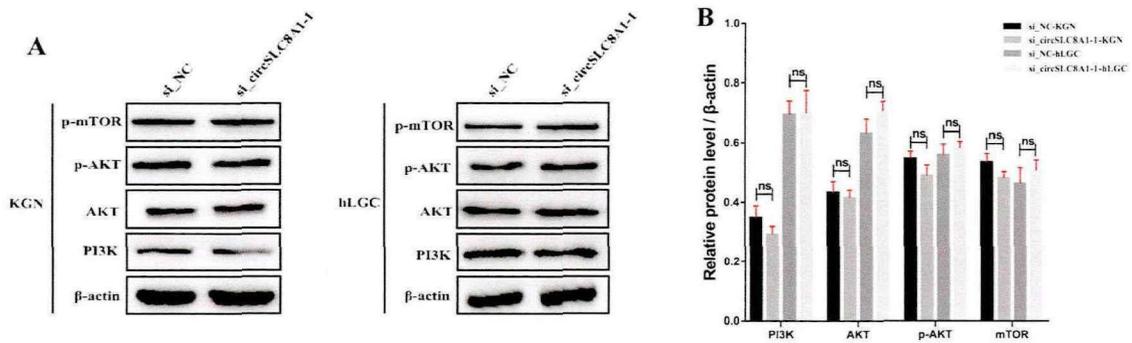


图 3-6 Western blot 检测干扰 *circSLC8A1* 表达对 PI3K/AKT/mTOR 通路的影响

Figure 3-6 Effects of reduced *circSLC8A1* expression on PI3K/AKT/mTOR pathway were verified by Western blot

(A-B) 在 KGN 和 hLGC 中，沉默 *circSLC8A1* 表达 48h 后，收集实验组和对照组细胞蛋白进行 Western blot 检测 PI3K、AKT、p-AKT、p-mTOR 的表达水平， β -actin 作为内参，然后利用 image J 对蛋白条带的灰度值进行比较。ns: 无统计学差异。

4.4 沉默 *circSLC8A1* 激活了自噬相关通路 JNK/c-Jun

丝裂原活化蛋白激酶 (Mitogen-activated protein kinases, MAPK) 是一个广泛存在于真核生物中的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族，主要包括 c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)、p38 丝裂原激活的蛋白激酶 (p38 Mitogen-activated Protein Kinase, p38 MAPK) 和调节蛋白激酶 (Extracellular Regulated Protein Kinase, ERK)。JNK 蛋白激酶能使 c-Jun 氨基末端活性区 Ser63 和 Ser73 发生磷酸化。MAPK 信号通路调控着多种细胞生理过程，包括增殖、分化、凋亡和应激反应等^[127]，近年来的研究也发现 MAPK 信号通路在调控细胞自噬中发挥着重要作用^[128, 129]。因此，我们提出假设：*circSLC8A1* 是否通过调控 MAPK 信号通路影响颗粒细胞的自噬进程？首先，在 KGN 和 hLGC 中，通过

Western blot 检测了 MAPK 通路蛋白的表达变化，结果显示沉默 *circSLC8A1* 表达能明显升高 p-JNK、c-Jun、p-c-Jun 的水平，而对 ERK、p-ERK、p38 MAPK、p-p38 MAPK 和 JNK 的表达无明显影响（图 3-7 A-B）。以上结果提示沉默 *circSLC8A1* 表达可能激活了颗粒细胞的 JNK/c-Jun 信号通路。

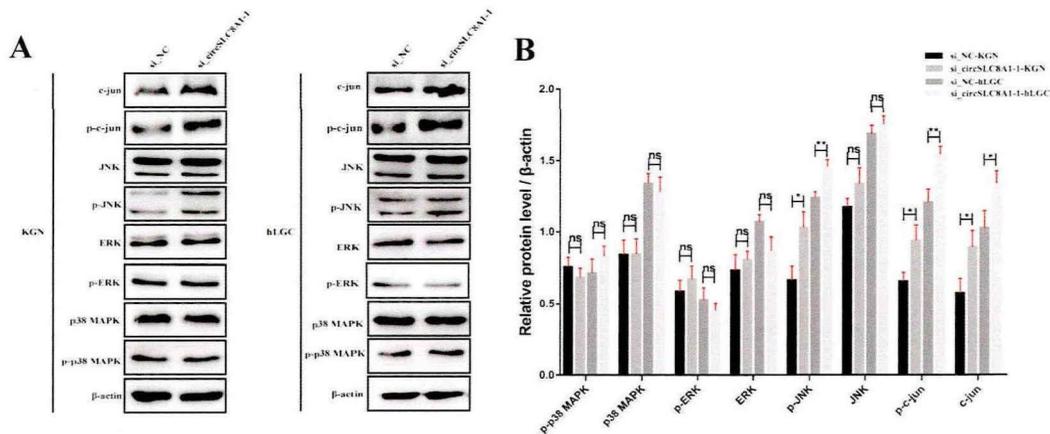


图 3-7 干扰 *circSLC8A1* 表达对 MAPK 信号通路的影响

Figure 3-7 Effects of reduced *circSLC8A1* expression on MAPKs signaling pathway

(A-B) 在 KGN 和 hLGC 中，沉默 *circSLC8A1* 表达 48h 后，收集实验组和对照组细胞蛋白进行 Western blot 检测 ERK、p38 MAPK、JNK、c-Jun 以及它们的磷酸化蛋白的表达水平， β -actin 作为内参，然后利用 image J 对蛋白条带的灰度值进行比较。* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，ns: 无统计学差异。

4.5 JNK 抑制剂 SP600125 能有效地拮抗 *circSLC8A1* 下调诱发的自噬增强

SP600125 是一种广谱的、ATP 竞争性的 JNK 抑制剂，同时能有效地抑制 c-Jun 的磷酸化，因此 SP600125 被广泛用于 JNK/c-Jun 信号通路的研究。在 KGN 和 hLGC 中，Western blot 结果显示 JNK 抑制剂 SP600125 能明显降低 p-JNK 和 p-c-jun 的水平，沉默 *circSLC8A1* 表达能明显升高 LC3B-II 水平以及降低 p62 水平，而加入 SP600125 处理后能明显拮抗这一效应（图 3-8 A-B）。此外，如图 3-9 所示，在 KGN 和 hLGC 中转染 RFP-GFP-LC3 腺病毒观察自噬流，结果显示 SP600125 抑制剂处理组自噬体的数量明显减少（黄色斑点减少）以及自噬活性减弱（红色斑点减少），提示 SP600125 抑制剂能明显拮抗

circSLC8A1 下调诱发的自噬增强, 进一步说明 *circSLC8A1* 通过调控 JNK/c-Jun 信号通路影响颗粒细胞的自噬活性。

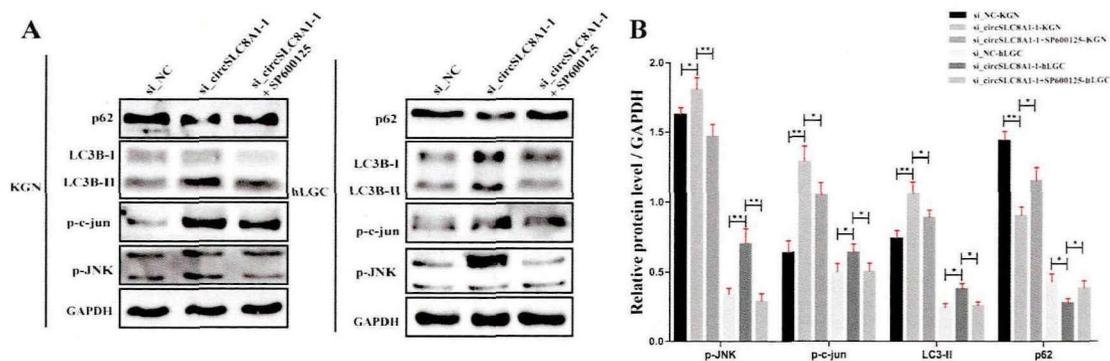


图 3-8 Western blot 检测 SP600125 处理下干扰 *circSLC8A1* 表达对自噬相关蛋白的影响

Figure 3-8 Effects of reduced *circSLC8A1* expression on autophagy-related proteins under the treatment of SP600125 inhibitor were verified by Western blot

(A-B) 在 KGN 和 hLGC 中, 沉默 *circSLC8A1* 表达后, 加入 10 μ M 的 SP600125 培养 24h, 收集各组细胞蛋白进行 Western blot 检测 p-JNK、p-c-Jun、LC3B 和 p62 的表达水平, GAPDH 作为内参蛋白, 然后利用 image J 对蛋白条带的灰度值进行比较。* P <0.05, ** P <0.01。

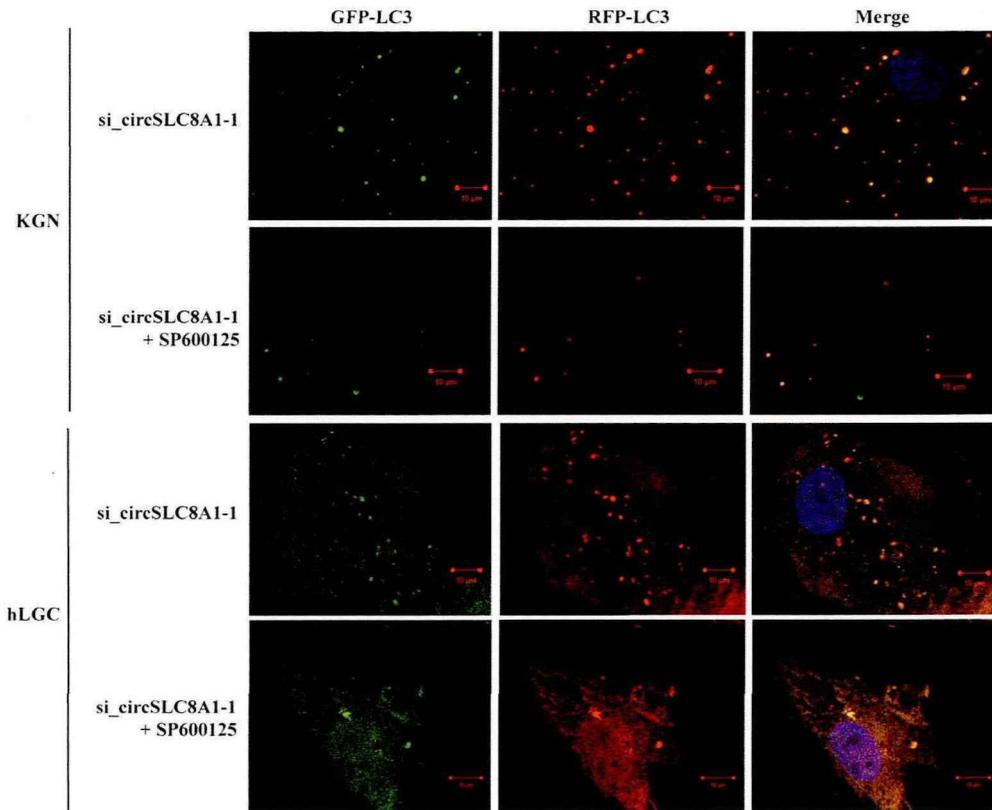


图 3-9 共聚焦显微镜观察 SP600125 处理下干扰 *circSLC8A1* 表达对自噬流的影响

Figure 3-9 Effects of reduced *circSLC8A1* expression on autophagy flux under the treatment of SP600125 inhibitor were observed by Confocal Microscopy

在 KGN 和 hLGC 中，转染 RFP-GFP-LC3 腺病毒，沉默 *circSLC8A1* 表达后，加入 10µM SP600125 培养 24h，然后采用共聚焦显微镜进行观察并拍摄。绿色荧光：GFP-LC3，红色荧光：RFP-LC3，红绿荧光 Merge 后的黄色荧光：自噬体，蓝色荧光：DAPI，标尺：10µm。

4.6 干扰 *circSLC8A1* 表达促进了颗粒细胞 *P21* 的表达，并且 SP600125 能有效地拮抗 *circSLC8A1* 下调诱发的 *P21* 蛋白水平升高

我们的前期研究发现 *P21* 在颗粒细胞自噬过程中同样扮演着重要角色^[130, 131]，并且发现 JNK/c-Jun 信号通路可以靶向作用于 *P21* 调控颗粒细胞的功能^[52]。因此，我们接下来探索了沉默 *circSLC8A1* 表达是否干扰 *P21* 的表达水平。在 KGN 和 hLGC 中，qRT-PCR 结果显示沉默 *circSLC8A1* 表达能明显提高 *P21*

的 mRNA 水平（图 3-10 A），Western blot 结果也显示沉默 *circSLC8A1* 表达能明显提高 P21 的蛋白水平（图 3-10 B-C），提示 *circSLC8A1* 可能影响着 P21 基因的转录和翻译过程。此外，通过 JNK/c-Jun 通路抑制剂 SP600125 处理，发现 SP600125 能有效地拮抗 *circSLC8A1* 下调诱发的 P21 蛋白水平升高（图 3-10 D-E），提示 JNK/c-Jun 信号通路可靶向作用于 *circSLC8A1* 调控的 P21 蛋白表达。

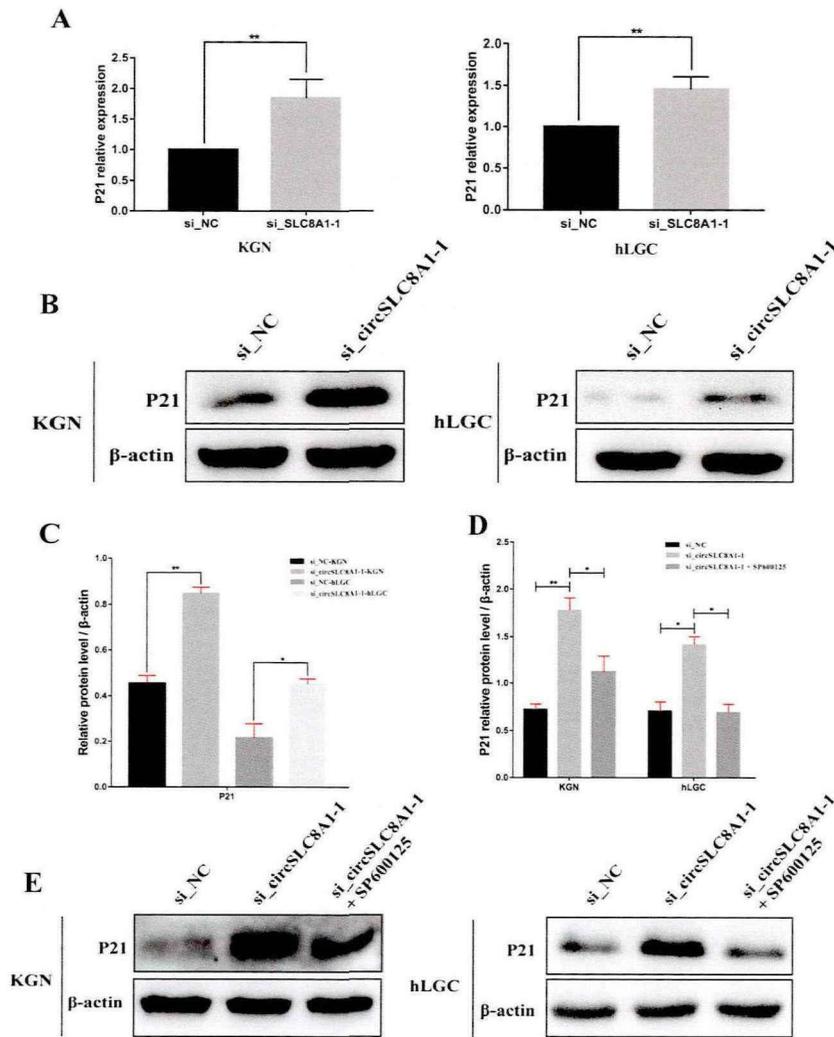


图 3-10 干扰 *circSLC8A1* 表达和 SP600125 抑制剂对 P21 表达水平的影响

Figure 3-10 Effects of reduced *circSLC8A1* expression and SP600125 inhibitor on P21 expression levels

(A) 在 KGN 和 hLGC 中，沉默 *circSLC8A1* 表达 48h 后，收集实验组和对照组细胞

进行 qRT-PCR 检测 *P21* 的 mRNA 水平, *GAPDH* 作为内参。(B-C) 在 KGN 和 hLGC 中, 沉默 *circSLC8A1* 表达 48h 后, 收集实验组和对照组细胞蛋白进行 Western blot 检测 *P21* 的蛋白水平, β -actin 作为内参, 然后利用 image J 对蛋白条带的灰度值进行比较。(D-E) 在 KGN 和 hLGC 中, 沉默 *circSLC8A1* 表达 48h 后, 继续加入 10 μ M SP600125 培养 24h, 收集实验组和对照组细胞蛋白进行 Western blot 检测 *P21* 的蛋白水平, β -actin 作为内参, 然后利用 image J 对蛋白条带的灰度值进行比较。* P <0.05, ** P <0.01。

4.7 沉默 *P21* 表达能有效地拮抗 *circSLC8A1* 下调诱发的自噬增强

为了进一步明确 *circSLC8A1* 是否通过调控 *P21* 表达和 JNK/c-Jun/*P21* 级联反应来影响颗粒细胞的自噬活性, 我们通过沉默 *P21* 表达进行了挽救实验。qRT-PCR 结果显示在 KGN 和 hLGC 中, 我们所合成的 siRNA 能明显敲低 *P21* 的 mRNA 水平 (图 3-11 A)。Western blot 结果同样显示合成的 siRNA 能明显降低 *P21* 的蛋白水平 (3-11 B-C)。沉默 *P21* 表达能明显降低 LC3B-II 的水平和提高 p62 的水平, 并且可以挽救 *circSLC8A1* 下调所致的 LC3B-II 水平升高和 p62 水平降低 (图 3-11 B-C)。此外, 在 KGN 和 hLGC 中转染 RFP-GFP-LC3 腺病毒观察自噬流, 如图 3-12 所示, 沉默 *P21* 表达后自噬体的数量明显减少 (黄色斑点减少) 以及自噬活性减弱 (红色斑点减少), 提示沉默 *P21* 表达能明显拮抗 *circSLC8A1* 下调诱发的自噬增强。以上结果进一步表明 *circSLC8A1* 可能通过调控 *P21* 基因表达和 JNK/c-Jun/*P21* 级联反应来影响 *P21* 的蛋白水平, 进而影响颗粒细胞的自噬活性。

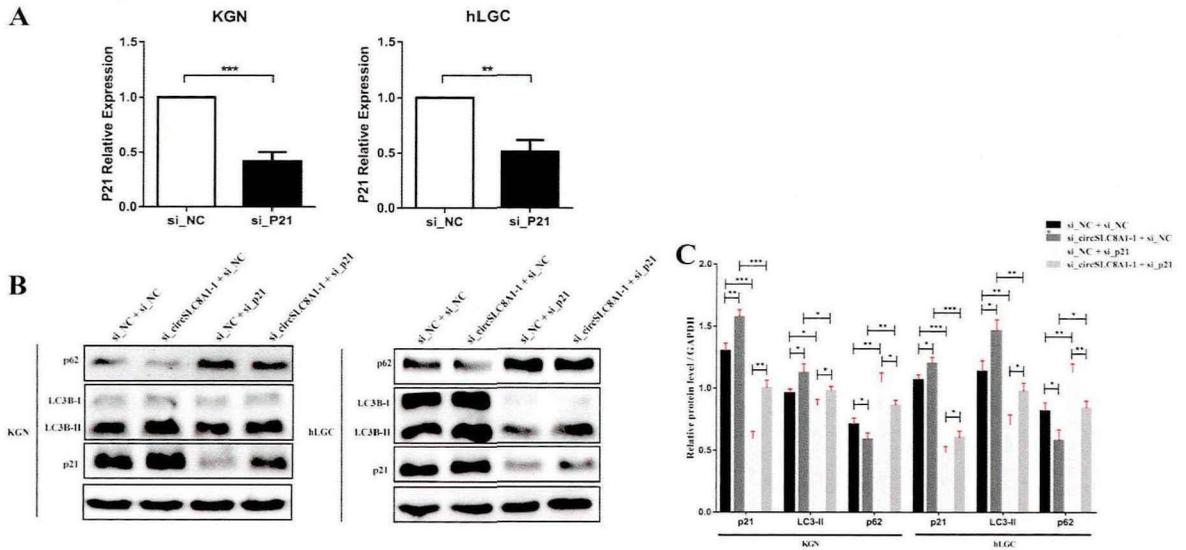


图 3-11 沉默 *P21* 表达对 *circSLC8A1* 调控的自噬相关蛋白的影响

Figure 3-11 Effects of *P21* knockdown on *circSLC8A1*-regulated autophagy-related proteins

(A) 在 KGN 和 hLGC 中, 转染 siRNA 48h 后, 收集实验组 and 对照组细胞进行 qRT-PCR 检测 *P21* 的 mRNA 水平, *GAPDH* 作为内参。(B-C) *si_circSLC8A1-1*/*si_NC* 与 *si_P21*/*si_NC* 共转染 48h 后, 收集各组细胞蛋白进行 Western blot 检测 LC3B、p62 和 *P21* 的表达水平, *GAPDH* 作为内参, 然后利用 image J 对蛋白条带的灰度值进行比较。
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

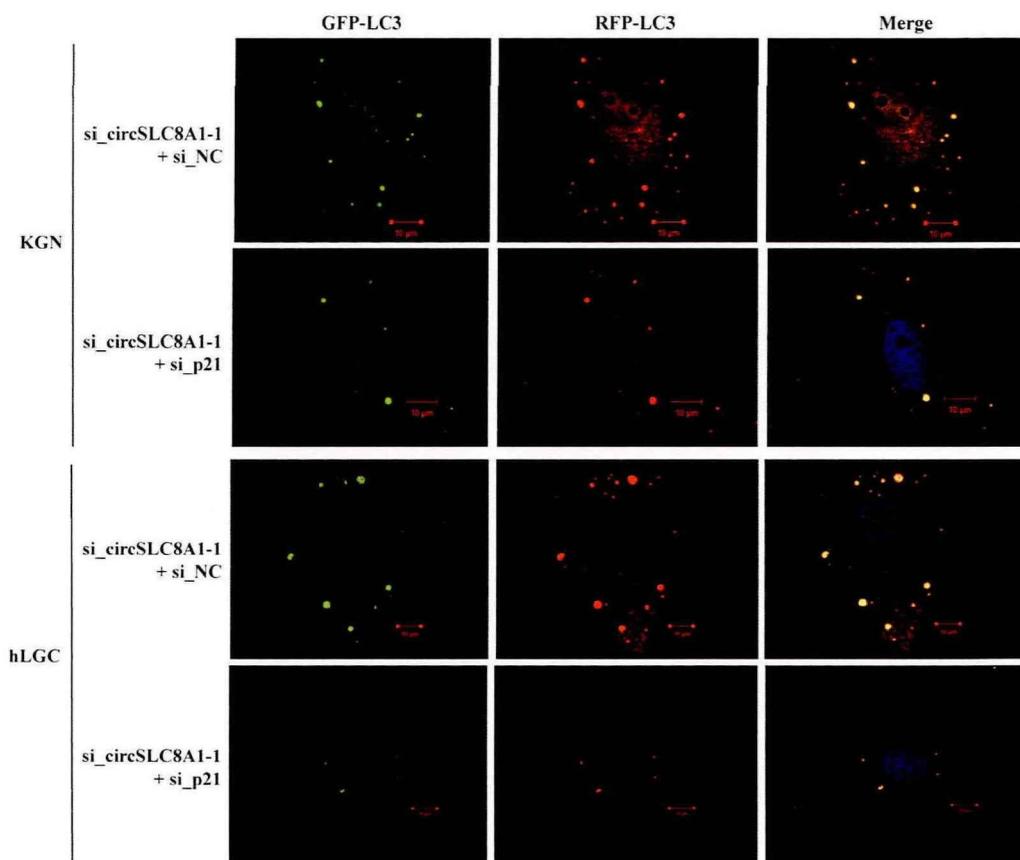


图 3-12 沉默 *P21* 表达对 *circSLC8A1* 调控的自噬流的影响

Figure 3-12 Effects of *P21* knockdown on *circSLC8A1*-regulated autophagy flux

在 KGN 和 hLGC 中，转染 RFP-GFP-LC3 腺病毒后，*si_circSLC8A1-1* 与 *si_P21*/*si_NC* 共转染 48h 后，采用共聚焦显微镜进行观察并拍摄。绿色荧光：GFP-LC3，红色荧光：RFP-LC3，红绿荧光 Merge 后的黄色荧光：自噬体，蓝色荧光：DAPI，标尺：10 μ m。

5 讨论

我们通过电镜、Western blot、CQ 抑制剂处理以及转染 RFP-GFP-LC3 双荧光腺病毒实验研究沉默 *circSLC8A1* 表达对颗粒细胞自噬的影响，结果显示沉默 *circSLC8A1* 表达能明显增加自噬体的数量并增强自噬流。为了进一步阐明 *circSLC8A1* 影响颗粒细胞自噬的分子机制，我们利用 Western blot 实验研究沉默 *circSLC8A1* 表达对相关自噬通路的影响，结果显示沉默 *circSLC8A1* 表达能

明显激活 JNK/c-Jun 信号通路和升高 *P21* 表达水平。然后通过 JNK/c-Jun 通路抑制剂 SP600125 处理、沉默 *P21* 进行挽救实验、Western blot 以及转染 RFP-GFP-LC3 双荧光腺病毒研究 JNK/c-Jun 信号通路和 *P21* 是否参与了 *circSLC8A1* 调控的自噬过程, 结果显示 SP600125 抑制剂能明显减弱沉默 *circSLC8A1* 表达诱发的自噬增强, 并降低 *P21* 的蛋白水平, 而沉默 *P21* 表达同样能挽救 *circSLC8A1* 下调诱发的自噬增强。这些结果提示 bPOI 患者卵巢颗粒细胞下调的 *circSLC8A1* 可能通过激活 JNK/c-Jun/*P21* 信号通路和促进 *P21* 表达引起颗粒细胞自噬活性增强, 导致卵泡生长发育、闭锁异常, 参与了 bPOI 及其相关不孕症的发生发展。

5.1 *circSLC8A1* 调控颗粒细胞自噬参与 POI 发病的研究进展

自噬已被证实在维持细胞内稳态、能量平衡、细胞和组织重塑、细胞防御细胞外损伤和病原体等方面发挥重要作用。自噬的过程主要包括: 自噬体的形成、自噬底物向溶酶体运送、自噬体与溶酶体融合形成自噬溶酶体、自噬体内容物被溶酶体降解, 并且在整个过程中, 时刻都受到不同 ATG 蛋白的调控。适当的自噬允许细胞成分和细胞器的循环, 从而维持细胞正常的功能。然而, 异常的自噬可导致细胞功能障碍, 甚至死亡。研究发现过度的自噬与代谢紊乱、肿瘤和退行性疾病的发生有关^[132-134]。

在调控卵巢功能和 POI 中, 自噬同样扮演着重要角色。自噬是维持卵母细胞发育、卵泡生长发育、卵泡闭锁和正常生殖周期所必需的^[135, 136]。颗粒细胞可能通过连接蛋白、激素和卵巢局部细胞因子以及多种信号通路的联合作用, 调节卵泡自噬与凋亡的平衡, 从而维持卵巢的正常功能^[119, 137, 138]。有研究发现 POI 大鼠卵巢泡膜-间质细胞的自噬明显增强^[54]。而在顺铂构建的 POI 小鼠模型中, 卵巢颗粒细胞的自噬和凋亡均增加^[53]。有研究团队在中国仓鼠卵巢细胞损伤模型中, 发现卵巢细胞过度自噬会引起线粒体和卵巢储备功能损伤, 这可能是卵巢早衰的发病机制之一^[139]。既往这些研究表明 POI 患者卵巢颗粒细胞可能存在自噬过度活化, 导致卵泡生长发育和闭锁异常。在本研究中, 我们同样发

现 bPOI 患者卵巢颗粒细胞下调的 *circSLC8A1* 可能促进了颗粒细胞的自噬，但具体作用机制尚不清楚。

5.2 *circSLC8A1* 调控颗粒细胞自噬的分子机制

更好地了解调控自噬过程的分子机制有助于建立自噬与不同疾病的发病机制之间的联系。为了探索与 bPOI 发病机制相关的潜在通路，我们前期获取了 bPOI 患者卵巢颗粒细胞的 circRNA 差异表达谱，并对前 10 个上调 circRNA 靶向基因进行 KEGG 通路富集分析，发现富集得分较高的相关信号通路包括 FoxO 信号通路、PI3K-AKT 信号通路和 MAPK 信号通路等^[9]。我们的前期研究表明 MAPK 信号通路在调控卵巢颗粒细胞自噬方面发挥着重要作用^[52]。MAPK 通路被认为是自噬的上游调节因子。MAPK 的家族成员主要包括 JNK、ERK 和 p38 MAPK，其中，JNK 在胚胎发育、增殖、分化、免疫应答以及癌细胞自噬和凋亡等多种生理病理过程中发挥作用^[140, 141]，而 c-Jun 表达会受到 JNK 蛋白激酶的调控。

越来越多的研究表明 JNK/c-Jun 信号通路在调控细胞自噬上发挥着重要作用^[142, 143]。在调控颗粒细胞自噬方面，有研究发现褪黑素可以通过抑制 JNK 依赖的自噬，从而降低小鼠颗粒细胞的氧化损伤^[144]。另一研究发现抑制 NF- κ B 可激活 JNK 信号通路，进而增强猪颗粒细胞的自噬活性^[145]。在本研究中，沉默 *circSLC8A1* 表达能明显增强颗粒细胞的自噬活性以及激活 JNK/c-Jun 信号通路，而用 JNK 通路抑制剂处理后，能明显拮抗这一效应，提示 bPOI 患者卵巢颗粒细胞中下调的 *circSLC8A1* 可能通过激活 JNK/c-Jun 信号通路来增强颗粒细胞的自噬活性。

越来越多的证据表明 *P21* 在自噬过程中起着重要作用。有研究发现冬凌草甲素可诱导 *P21* 表达上调，进而增强前列腺癌细胞的自噬活性^[146]。奎纳克林通过 *P21* 依赖的信号通路调控结肠癌细胞的自噬^[147]。我们的前期研究发现 lncRNA-*TUG1*^[131]和 *let-7e*^[130]可通过调控 *P21* 表达来影响卵巢颗粒细胞的自噬活性。此外，既往研究发现 *P21* 是 JNK 通路的下游调控分子^[148, 149]，同样，在

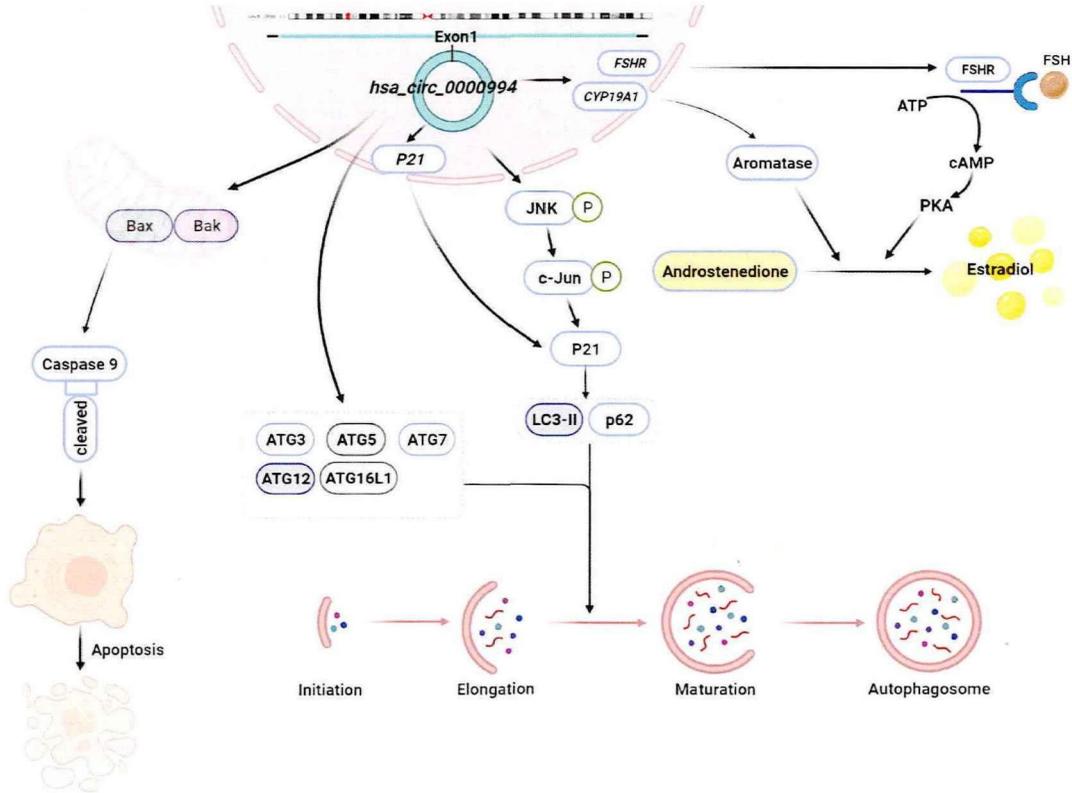
本研究中，我们也探索了自噬以及 JNK/c-Jun 与 *P21* 之间的关系，结果显示干扰 *circSLC8A1* 表达能明显促进 *P21* 的表达水平，而 JNK 通路抑制剂能明显降低 *P21* 的蛋白水平，提示 *circSLC8A1* 可通过调控 JNK/c-Jun 信号通路和 *P21* 基因表达两种途径来影响 *P21* 的蛋白水平。通过 Rescue 实验，沉默 *P21* 表达能拮抗 *circSLC8A1* 下调诱发的自噬活性增强，提示 bPOI 患者卵巢颗粒细胞中下调的 *circSLC8A1* 可能通过促进 *P21* 表达和激活 JNK/c-Jun/*P21* 信号通路来增强卵巢颗粒细胞的自噬活性。

有研究报道自噬小体的积累可诱导颗粒细胞凋亡^[150]。目前普遍认为自噬可能是通过过度降解方式导致细胞死亡的。应激发生时，通过自噬清除损伤蛋白和细胞器等细胞成分，这对细胞存活有积极作用。然而，持续的应激或 Atg 过度表达会导致自噬过度，最终导致细胞死亡。因此，bPOI 患者卵巢颗粒细胞中下调的 *circSLC8A1* 可能通过促进颗粒细胞自噬，进而导致颗粒细胞凋亡增加，影响了卵泡生长发育和闭锁，从而推动了 POI 及其相关不孕症的发病进程。当然，*circSLC8A1* 调控的细胞自噬和细胞凋亡之间的关系未来仍有待进一步阐明。

6 小结

在 KGN 和 hLGC 中，通过沉默 *circSLC8A1* 表达发现颗粒细胞的自噬活性明显增强，并且 JNK/c-Jun/*P21* 信号通路和 *P21* 基因可能参与了这一过程的调控。bPOI 卵巢颗粒细胞中下调的 *circSLC8A1* 可能通过增强颗粒细胞的自噬，导致自噬体在卵巢内积累，从而诱发颗粒细胞凋亡，影响了卵泡的生长发育和闭锁，最终导致 POI 的发生。

全文小结



1 研究成果

(1) *circSLC8A1* 在 bPOI 患者卵巢颗粒细胞中的表达明显下调，其表达水平与患者血清基础 FSH、AMH、AFC、年龄、获卵数相关。*circSLC8A1* 具有诊断 bPOI 患者的潜力。

(2) *circSLC8A1* 是一个闭合环状 RNA，主要定位于卵巢颗粒细胞的细胞质中，沉默 *circSLC8A1* 能明显抑制卵巢颗粒细胞的增殖，并且促进 Bax/Bak/Caspase-9 依赖的凋亡途径，以及通过抑制 *CYP19A1*、*FSHR* 基因表达和 FSH/cAMP/PKA 信号通路来降低卵巢颗粒细胞的 E₂ 合成。

(3) 沉默 *circSLC8A1* 表达能明显促进卵巢颗粒细胞的自噬活性，这可能是通过影响 *P21* 基因表达和 JNK/c-Jun/*P21* 信号通路来调控的。

因此，本研究为 bPOI 发病机制的研究提供了一种新的表观遗传机制，*circSLC8A1* 及其作用机制为寻找 bPOI 早期诊断性生物标志物以及治疗靶点提供了新的思路。

2 不足与展望

(1) 由于 bPOI 患者的卵巢颗粒细胞获取难度大，本研究收集的 bPOI 患者卵巢颗粒细胞的样本量较少，并且目前仅收集了处于生化异常期的 POI 患者卵巢颗粒细胞，未来仍需进一步扩大临床样本量，以及收集处于不同分期的 POI 患者卵巢颗粒细胞进行检测，这有助于阐明 *circSLC8A1* 与不同阶段 POI 进展的关系。

(2) 本研究仅对 *circSLC8A1* 进行了体外功能缺失实验，未来仍需进一步研究 *circSLC8A1* 过表达对卵巢颗粒细胞功能的影响，并且需要进行动物体内实验进行验证。

(3) 本研究仅研究了 *circSLC8A1* 对卵巢颗粒细胞功能的影响，而颗粒细胞与卵母细胞处于相同的微环境中，未来仍需进行 *circSLC8A1* 影响颗粒细胞-卵母细胞“对话”的分子机制研究。

(4) 考虑到 POI 病因的高度异质性，单一的遗传基因或信号不足以解释所有 POI 的遗传机制，未来仍需研究与 *circSLC8A1* 关联的多基因相互作用以及细胞内大量的分子信号，进一步构建 POI 的基因遗传网络。

参考文献

- [1] ROCCA W, GROSSARDT B, DE ANDRADE M, et al. Survival patterns after oophorectomy in premenopausal women: a population-based cohort study [J]. *The Lancet Oncology*, 2006, 7(10): 821-8.
- [2] WEBBER L, DAVIES M, ANDERSON R, et al. ESHRE Guideline: management of women with premature ovarian insufficiency [J]. *Human reproduction (Oxford, England)*, 2016, 31(5): 926-37.
- [3] WELT C. Primary ovarian insufficiency: a more accurate term for premature ovarian failure [J]. *Clinical endocrinology*, 2008, 68(4): 499-509.
- [4] JIAO X, ZHANG H, KE H, et al. Premature Ovarian Insufficiency: Phenotypic Characterization Within Different Etiologies [J]. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 2017, 102(7): 2281-90.
- [5] CORDTS E, CHRISTOFOLINI D, DOS SANTOS A, et al. Genetic aspects of premature ovarian failure: a literature review [J]. *Archives of gynecology and obstetrics*, 2011, 283(3): 635-43.
- [6] GOSWAMI D, CONWAY G. Premature ovarian failure [J]. *Hormone research*, 2007, 68(4): 196-202.
- [7] QIN C, YUAN Z, YAO J, et al. AMH and AMHR2 genetic variants in Chinese women with primary ovarian insufficiency and normal age at natural menopause [J]. *Reproductive biomedicine online*, 2014, 29(3): 311-8.
- [8] An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome [J]. *Nature*, 2012, 489(7414): 57-74.
- [9] ZHOU X, LI Y, ZHANG J, et al. Expression profiles of circular RNA in granulosa cells from women with biochemical premature ovarian insufficiency [J]. *Epigenomics*, 2020, 12(4): 319-32.
- [10] BAKALOV V, ANASTI J, CALIS K, et al. Autoimmune oophoritis as a mechanism of follicular dysfunction in women with 46,XX spontaneous premature ovarian failure [J]. *Fertility and sterility*, 2005, 84(4): 958-65.
- [11] ABIR R, FISCH B, NAHUM R, et al. Turner's syndrome and fertility: current status and possible putative prospects [J]. *Human reproduction update*, 2001, 7(6): 603-10.
- [12] BEN-NAGI J, PANAY N. Premature ovarian insufficiency: how to improve reproductive outcome? [J]. *Climacteric : the journal of the International Menopause Society*, 2014, 17(3): 242-6.
- [13] OYESANYA O, OLUFOWOBI O, ROSS W, et al. Prognosis of oocyte donation cycles: a prospective comparison of the in vitro fertilization-embryo transfer cycles of recipients who used shared oocytes versus those who used altruistic donors [J]. *Fertility and sterility*, 2009, 92(3): 930-6.
- [14] 陈子江, 田秦杰, 乔杰, et al. 早发性卵巢功能不全的临床诊疗中国专家共识 [J]. *中华妇产科杂志*, 2017, 52(09): 577-81.
- [15] QIN Y, JIAO X, SIMPSON J, et al. Genetics of primary ovarian insufficiency: new developments and opportunities [J]. *Human reproduction update*, 2015, 21(6): 787-808.
- [16] HEARD E, TURNER J. Function of the sex chromosomes in mammalian fertility [J]. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2011, 3(10): a002675.
- [17] PELLESTOR F, ANAHORY T, LEFORT G, et al. Complex chromosomal rearrangements: origin and meiotic behavior [J]. *Human reproduction update*, 2011, 17(4): 476-94.
- [18] PORTNOI M, ABOURA A, TACHDJIAN G, et al. Molecular cytogenetic studies of Xq critical regions in premature ovarian failure patients [J]. *Human reproduction (Oxford, England)*, 2006, 21(9): 2329-34.
- [19] LAKHAL B, BRAHAM R, BERGUIGUA R, et al. Cytogenetic analyses of premature ovarian failure using karyotyping and interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) in a group of 1000 patients [J]. *Clinical genetics*, 2010, 78(2): 181-5.
- [20] MOYSÉS-OLIVEIRA M, GUILHERME R S, DANTAS A, et al. Genetic mechanisms leading to primary amenorrhea in balanced X-autosome translocations [J]. *Fertility and sterility*, 2015, 103(5): 1289-96.e2.
- [21] SIMPSON J. Genetic and phenotypic heterogeneity in ovarian failure: overview of selected candidate genes [J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008, 1135(146-54).

- [22] CHAPMAN C, CREE L, SHELLING A. The genetics of premature ovarian failure: current perspectives [J]. *International journal of women's health*, 2015, 7(799-810).
- [23] VUJOVIC S. Aetiology of premature ovarian failure [J]. *Menopause international*, 2009, 15(2): 72-5.
- [24] DING C, QIAN C, HOU S, et al. Exosomal miRNA-320a Is Released from hAMSCs and Regulates SIRT4 to Prevent Reactive Oxygen Species Generation in POI [J]. *Molecular therapy Nucleic acids*, 2020, 21(37-50).
- [25] WANG X, ZHANG X, DANG Y, et al. Long noncoding RNA HCP5 participates in premature ovarian insufficiency by transcriptionally regulating MSH5 and DNA damage repair via YB1 [J]. *Nucleic acids research*, 2020, 48(8): 4480-91.
- [26] MEMCZAK S, JENS M, ELEFSINIOTI A, et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency [J]. *Nature*, 2013, 495(7441): 333-8.
- [27] ALTESHA M, NI T, KHAN A, et al. Circular RNA in cardiovascular disease [J]. *Journal of cellular physiology*, 2019, 234(5): 5588-600.
- [28] SALZMAN J, CHEN R, OLSEN M, et al. Cell-type specific features of circular RNA expression [J]. *PLoS genetics*, 2013, 9(9): e1003777.
- [29] SALZMAN J, GAWAD C, WANG P, et al. Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types [J]. *PloS one*, 2012, 7(2): e30733.
- [30] JECK W, SORRENTINO J, WANG K, et al. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats [J]. *RNA (New York, NY)*, 2013, 19(2): 141-57.
- [31] OUDEJANS C, MANDERS V, VISSER A, et al. Circular RNA Sequencing of Maternal Platelets: A Novel Tool for the Identification of Pregnancy-Specific Biomarkers [J]. *Clinical chemistry*, 2021, 67(3): 508-17.
- [32] LI S, HU W, DENG F, et al. Identification of Circular RNA hsa_circ_0001599 as a Novel Biomarker for Large-Artery Atherosclerotic Stroke [J]. *DNA and cell biology*, 2021, 40(3): 457-68.
- [33] WEI J, WEI W, XU H, et al. Circular RNA hsa_circRNA_102958 may serve as a diagnostic marker for gastric cancer [J]. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers*, 2020, 27(2): 139-45.
- [34] LUO H, PENG Y, LUO H, et al. Circular RNA hsa_circ_0001380 in peripheral blood as a potential diagnostic biomarker for active pulmonary tuberculosis [J]. *Molecular medicine reports*, 2020, 21(4): 1890-6.
- [35] TAN S, GOU Q, PU W, et al. Circular RNA F-circEA produced from EML4-ALK fusion gene as a novel liquid biopsy biomarker for non-small cell lung cancer [J]. *Cell research*, 2018, 28(6): 693-5.
- [36] 张新玥. MicroRNA-127-5p 及环状 RNA 在早发性卵巢功能不全中的作用及机制研究 [D]; 山东大学, 2021.
- [37] 陈珊燕. POI 患者血浆中 circRNA 表达谱及不同阶段中医体质研究 [D]; 广州中医药大学, 2019.
- [38] FAGERBERG L, HALLSTRÖM B, OKSVOLD P, et al. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics [J]. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 2014, 13(2): 397-406.
- [39] LI M, DING W, TARIQ M, et al. ncx1A circular transcript of gene mediates ischemic myocardial injury by targeting miR-133a-3p [J]. *Theranostics*, 2018, 8(21): 5855-69.
- [40] YONG W, DENG S, TAN Y, et al. Circular RNA circSLC8A1 inhibits the proliferation and invasion of non-small cell lung cancer cells through targeting the miR-106b-5p /FOXJ3 axis [J]. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*, 2021, 20(24): 2597-606.
- [41] WANG D, YAN S, WANG L, et al. circSLC8A1 Acts as a Tumor Suppressor in Prostate Cancer via Sponging miR-21 [J]. *BioMed research international*, 2021, 2021(6614591).
- [42] ZHU Q, ZHANG X, ZAI H, et al. circSLC8A1 sponges miR-671 to regulate breast cancer tumorigenesis via PTEN/PI3k/Akt pathway [J]. *Genomics*, 2021, 113(398-410).
- [43] LIM T, ALIWARGA E, LUU T, et al. Targeting the highly abundant circular RNA circSlc8a1 in cardiomyocytes attenuates pressure overload induced hypertrophy [J]. *Cardiovascular research*, 2019, 115(14): 1998-2007.
- [44] JAHN C, BÄR C, THUM T. CircSlc8a1, breaking a vicious circle in cardiac hypertrophy [J]. *Cardiovascular research*, 2019, 115(14): 1946-7.
- [45] RUAN Z, YU W, WANG S. CircNCX1/miR-133a: A potential novel biomarker and risk factor

- predictor for myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *International journal of cardiology*, 2020, 299(256).
- [46] LU Q, LIU T, FENG H, et al. Circular RNA circSLC8A1 acts as a sponge of miR-130b/miR-494 in suppressing bladder cancer progression via regulating PTEN [J]. *Molecular cancer*, 2019, 18(1): 111.
- [47] HANAN M, SIMCHOVITZ A, YAYON N, et al. A Parkinson's disease CircRNAs Resource reveals a link between circSLC8A1 and oxidative stress [J]. *EMBO molecular medicine*, 2020, 12(9): e11942.
- [48] SHELLING A. Premature ovarian failure [J]. *Reproduction (Cambridge, England)*, 2010, 140(5): 633-41.
- [49] WANG F, CHEN X, SUN B, et al. Hypermethylation-mediated downregulation of lncRNA PVT1 promotes granulosa cell apoptosis in premature ovarian insufficiency via interacting with Foxo3a [J]. *Journal of cellular physiology*, 2021, 236(7): 5162-75.
- [50] PARK H, CHUGH R, EL ANDALOUSSI A, et al. Human BM-MSC secretome enhances human granulosa cell proliferation and steroidogenesis and restores ovarian function in primary ovarian insufficiency mouse model [J]. *Scientific reports*, 2021, 11(1): 4525.
- [51] JIAO X, ZHANG X, LI N, et al. T deficiency-mediated T1 response causes human premature ovarian insufficiency through apoptosis and steroidogenesis dysfunction of granulosa cells [J]. *Clinical and translational medicine*, 2021, 11(6): e448.
- [52] ZHOU X, ZHANG J, LI Y, et al. Advanced Oxidation Protein Products Induce G1/G0-Phase Arrest in Ovarian Granulosa Cells via the ROS-JNK/p38 MAPK-p21 Pathway in Premature Ovarian Insufficiency [J]. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2021, 2021(6634718).
- [53] WU Y, MA C, ZHAO H, et al. Alleviation of endoplasmic reticulum stress protects against cisplatin-induced ovarian damage [J]. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 2018, 16(1): 85.
- [54] LU X, BAO H, CUI L, et al. hUMSC transplantation restores ovarian function in POI rats by inhibiting autophagy of theca-interstitial cells via the AMPK/mTOR signaling pathway [J]. *Stem cell research & therapy*, 2020, 11(1): 268.
- [55] LIU C, PENG J, MATZUK M, et al. Lineage specification of ovarian theca cells requires multicellular interactions via oocyte and granulosa cells [J]. *Nature communications*, 2015, 6(6934).
- [56] COTICCHIO G, DAL CANTO M, MIGNINI RENZINI M, et al. Oocyte maturation: gamete-somatic cells interactions, meiotic resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic reorganization [J]. *Human reproduction update*, 2015, 21(4): 427-54.
- [57] KRYSKO D, DIEZ-FRAILE A, CRIEL G, et al. Life and death of female gametes during oogenesis and folliculogenesis [J]. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 2008, 13(9): 1065-87.
- [58] KAUR S, ARCHER K, DEVI M, et al. Differential gene expression in granulosa cells from polycystic ovary syndrome patients with and without insulin resistance: identification of susceptibility gene sets through network analysis [J]. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 2012, 97(10): E2016-21.
- [59] 陈海霞, 白晓红. 卵巢储备功能减退的相关分子遗传学研究进展 [J]. *国际生殖健康/计划生育杂志*, 2020, 39(05): 411-5.
- [60] TAL R, SEIFER D. Ovarian reserve testing: a user's guide [J]. *American journal of obstetrics and gynecology*, 2017, 217(2): 129-40.
- [61] HENDRIKS D, MOL B, BANCSI L, et al. Antral follicle count in the prediction of poor ovarian response and pregnancy after in vitro fertilization: a meta-analysis and comparison with basal follicle-stimulating hormone level [J]. *Fertility and sterility*, 2005, 83(2): 291-301.
- [62] JAYAPRAKASAN K, CAMPBELL B, HOPKISSON J, et al. Establishing the intercycle variability of three-dimensional ultrasonographic predictors of ovarian reserve [J]. *Fertility and sterility*, 2008, 90(6): 2126-32.
- [63] HANSEN K, HODNETT G, KNOWLTON N, et al. Correlation of ovarian reserve tests with histologically determined primordial follicle number [J]. *Fertility and sterility*, 2011, 95(1): 170-5.
- [64] VAN ZONNEVELD A, KÖLLING M, BIJKERK R, et al. Circular RNAs in kidney disease and cancer [J]. *Nature reviews Nephrology*, 2021, 17(12): 814-26.
- [65] LI Y, ZHENG Q, BAO C, et al. Circular RNA is enriched and stable in exosomes: a promising

- biomarker for cancer diagnosis [J]. *Cell research*, 2015, 25(8): 981-4.
- [66] TIAN M, XUE J, DAI C, et al. CircSLC8A1 and circNFIX can be used as auxiliary diagnostic markers for sudden cardiac death caused by acute ischemic heart disease [J]. *Scientific reports*, 2021, 11(1): 4695.
- [67] WU G, XIA J, YANG Z, et al. CircASPH promotes KGN cells proliferation through miR-375/MAP2K6 axis in Polycystic Ovary Syndrome [J]. *Journal of cellular and molecular medicine*, 2022, 26(6): 1817-25.
- [68] HUANG P, DU S, LIN Y, et al. Identification of Three Potential circRNA Biomarkers of Polycystic Ovary Syndrome by Bioinformatics Analysis and Validation [J]. *International journal of general medicine*, 2021, 14(5959-68).
- [69] WANG D, LUO Y, WANG G, et al. CircATRNL1 promotes epithelial-mesenchymal transition in endometriosis by upregulating Yes-associated protein 1 in vitro [J]. *Cell death & disease*, 2020, 11(7): 594.
- [70] WANG D, CUI L, YANG Q, et al. Circular RNA circZFPM2 promotes epithelial-mesenchymal transition in endometriosis by regulating miR-205-5p/ZEB1 signalling pathway [J]. *Cellular signalling*, 2021, 87(110145).
- [71] SUN L, WEI Y, WANG J. Circular RNA PIP5K1A (circPIP5K1A) accelerates endometriosis progression by regulating the miR-153-3p/Thymosin Beta-4 X-Linked (TMSB4X) pathway [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 7104-18.
- [72] LI Q, LI N, LIU H, et al. Estrogen-decreased hsa_circ_0001649 promotes stromal cell invasion in endometriosis [J]. *Reproduction (Cambridge, England)*, 2020, 160(4): 511-9.
- [73] ZHOU W, CAI Z, LIU J, et al. Circular RNA: metabolism, functions and interactions with proteins [J]. *Molecular cancer*, 2020, 19(1): 172.
- [74] MENG S, ZHOU H, FENG Z, et al. CircRNA: functions and properties of a novel potential biomarker for cancer [J]. *Molecular cancer*, 2017, 16(1): 94.
- [75] LI X, YANG L, CHEN L. The Biogenesis, Functions, and Challenges of Circular RNAs [J]. *Molecular cell*, 2018, 71(3): 428-42.
- [76] ZHU J, LIU X, LUAN Z, et al. Circular RNA circSLC8A1 inhibits the proliferation and invasion of glioma cells through targeting the miR-214-5p/CDC27 axis [J]. *Metabolic brain disease*, 2022, 37(4): 1015-23.
- [77] CHOU C, CHEN M. The Effect of Steroid Hormones on Ovarian Follicle Development [J]. *Vitamins and hormones*, 2018, 107(155-75).
- [78] SAINT-DIZIER M, MALANDAIN E, THOUMIRE S, et al. Expression of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone receptors during follicular growth in the domestic cat ovary [J]. *Molecular reproduction and development*, 2007, 74(8): 989-96.
- [79] GEORGE J, DILLE E, HECKERT L. Current concepts of follicle-stimulating hormone receptor gene regulation [J]. *Biology of reproduction*, 2011, 84(1): 7-17.
- [80] GORE-LANGTON R, DORRINGTON J. FSH induction of aromatase in cultured rat granulosa cells measured by a radiometric assay [J]. *Molecular and cellular endocrinology*, 1981, 22(2): 135-51.
- [81] HUANG X, WU B, CHEN M, et al. Depletion of exosomal circLDLR in follicle fluid derepresses miR-1294 function and inhibits estradiol production via CYP19A1 in polycystic ovary syndrome [J]. *Aging*, 2020, 12(15): 15414-35.
- [82] NISHI Y, YANASE T, MU Y, et al. Establishment and characterization of a steroidogenic human granulosa-like tumor cell line, KGN, that expresses functional follicle-stimulating hormone receptor [J]. *Endocrinology*, 2001, 142(1): 437-45.
- [83] SIMONI M, GROMOLL J, NIESCHLAG E. The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology [J]. *Endocrine reviews*, 1997, 18(6): 739-73.
- [84] MUKASA C, NOMURA M, TANAKA T, et al. Activin signaling through type IB activin receptor stimulates aromatase activity in the ovarian granulosa cell-like human granulosa (KGN) cells [J]. *Endocrinology*, 2003, 144(4): 1603-11.
- [85] JIA W, XU B, WU J. Circular RNA expression profiles of mouse ovaries during postnatal development and the function of circular RNA epidermal growth factor receptor in granulosa cells [J]. *Metabolism: clinical and experimental*, 2018, 85(192-204).

- [86] WANG H, ZHANG Y, ZHANG J, et al. circSLC41A1 Resists Porcine Granulosa Cell Apoptosis and Follicular Atresia by Promoting SRSF1 through miR-9820-5p Sponging [J]. *International journal of molecular sciences*, 2022, 23(3):
- [87] ZHAO C, ZHOU Y, SHEN X, et al. Circular RNA expression profiling in the fetal side of placenta from maternal polycystic ovary syndrome and circ_0023942 inhibits the proliferation of human ovarian granulosa cell [J]. *Archives of gynecology and obstetrics*, 2020, 301(4): 963-71.
- [88] WU Y, XIAO H, PI J, et al. The circular RNA aplacirc_13267 upregulates duck granulosa cell apoptosis by the apla-miR-1-13/THBS1 signaling pathway [J]. *Journal of cellular physiology*, 2020, 235(5750-63).
- [89] MA M, WANG H, ZHANG Y, et al. circRNA-Mediated Inhibin-Activin Balance Regulation in Ovarian Granulosa Cell Apoptosis and Follicular Atresia [J]. *International journal of molecular sciences*, 2021, 22(17):
- [90] LI X, GAO F, FAN Y, et al. A novel identified circ-ANKHD1 targets the miR-27a-3p/SFRP1 signaling pathway and modulates the apoptosis of granulosa cells [J]. *Environmental science and pollution research international*, 2021, 28(41): 57459-69.
- [91] CAI H, CHANG T, LI Y, et al. DDX10Circular is associated with ovarian function and assisted reproductive technology outcomes through modulating the proliferation and steroidogenesis of granulosa cells [J]. *Aging*, 2021, 13(7): 9592-612.
- [92] LU J, XUE Y, WANG Y, et al. CiRS-126 inhibits proliferation of ovarian granulosa cells through targeting the miR-21-PDCD4-ROS axis in a polycystic ovarian syndrome model [J]. *Cell and tissue research*, 2020, 381(1): 189-201.
- [93] 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]. *Biochimica et biophysica acta Gene regulatory mechanisms*, 2019, 1862(10): 194420.
- [94] ZHANG D, YI S, CAI B, et al. Involvement of ferroptosis in the granulosa cells proliferation of PCOS through the circRHBG/miR-515/SLC7A11 axis [J]. *Annals of translational medicine*, 2021, 9(16): 1348.
- [95] XU L, XIONG F, BAI Y, et al. Circ_0043532 regulates miR-182/SGK3 axis to promote granulosa cell progression in polycystic ovary syndrome [J]. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 2021, 19(1): 167.
- [96] LU X, GAO H, ZHU B, et al. XIAPCircular RNA circ_RANBP9 exacerbates polycystic ovary syndrome via microRNA-136-5p/ axis [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 6748-58.
- [97] DENG L, CHEN Q, XIE J, et al. circPUM1 promotes polycystic ovary syndrome progression by sponging to miR-760 [J]. *Gene*, 2020, 754(144903).
- [98] LIU J, DING J, QU B, et al. CircPSMC3 alleviates the symptoms of PCOS by sponging miR-296-3p and regulating PTEN expression [J]. *Journal of cellular and molecular medicine*, 2020, 24(18): 11001-11.
- [99] CHEN Y, MIAO J, LOU G. Knockdown of circ-FURIN suppresses the proliferation and induces apoptosis of granular cells in polycystic ovary syndrome via miR-195-5p/BCL2 axis [J]. *Journal of ovarian research*, 2021, 14(1): 156.
- [100] LI M. The role of P53 up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) in ovarian development, cardiovascular and neurodegenerative diseases [J]. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 2021, 26(235-47).
- [101] PARRISH A, FREEL C, KORNBLUTH S. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function [J]. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2013, 5(6):
- [102] ESKES R, DESAGHER S, ANTONSSON B, et al. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane [J]. *Molecular and cellular biology*, 2000, 20(3): 929-35.
- [103] WEI M, ZONG W, CHENG E, et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death [J]. *Science (New York, NY)*, 2001, 292(5517): 727-30.
- [104] FINDLAY J, BRITT K, KERR J, et al. The road to ovulation: the role of oestrogens [J]. *Reproduction, fertility, and development*, 2001, 13(543-7).
- [105] IRELAND J, ZIELAK-STECIWKO A, JIMENEZ-KRASSEL F, et al. Variation in the ovarian reserve is linked to alterations in intrafollicular estradiol production and ovarian biomarkers of follicular differentiation and oocyte quality in cattle [J]. *Biology of reproduction*, 2009, 80(5): 954-64.

- [106] KLIONSKY D, EMR S. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation [J]. *Science* (New York, NY), 2000, 290(5497): 1717-21.
- [107] OHSUMI Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems [J]. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2001, 2(3): 211-6.
- [108] KABEYA Y, MIZUSHIMA N, UENO T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing [J]. *The EMBO journal*, 2000, 19(21): 5720-8.
- [109] SAHANI M, ITAKURA E, MIZUSHIMA N. Expression of the autophagy substrate SQSTM1/p62 is restored during prolonged starvation depending on transcriptional upregulation and autophagy-derived amino acids [J]. *Autophagy*, 2014, 10(3): 431-41.
- [110] LUO M, ZHAO X, SONG Y, et al. Nuclear autophagy: An evolutionarily conserved mechanism of nuclear degradation in the cytoplasm [J]. *Autophagy*, 2016, 12(11): 1973-83.
- [111] YANG Z, KLIONSKY D. Eaten alive: a history of macroautophagy [J]. *Nature cell biology*, 2010, 12(9): 814-22.
- [112] ARIOS A, LAHIRI V, LEI Y, et al. A perspective on the role of autophagy in cancer [J]. *Biochimica et biophysica acta Molecular basis of disease*, 2021, 1867(12): 166262.
- [113] PARK H, KANG J, LEE S. Autophagy in Neurodegenerative Diseases: A Hunter for Aggregates [J]. *International journal of molecular sciences*, 2020, 21(9):
- [114] REN J, ZHANG Y. Targeting Autophagy in Aging and Aging-Related Cardiovascular Diseases [J]. *Trends in pharmacological sciences*, 2018, 39(12): 1064-76.
- [115] JIN M, ZHANG Y. Autophagy and Autoimmune Diseases [J]. *Advances in experimental medicine and biology*, 2020, 1207(405-8).
- [116] KITADA M, KOYA D. Autophagy in metabolic disease and ageing [J]. *Nature reviews Endocrinology*, 2021, 17(11): 647-61.
- [117] SRIDHAR S, BOTBOL Y, MACIAN F, et al. Autophagy and disease: always two sides to a problem [J]. *The Journal of pathology*, 2012, 226(2): 255-73.
- [118] GAWRILUK T, HALE A, FLAWS J, et al. Autophagy is a cell survival program for female germ cells in the murine ovary [J]. *Reproduction* (Cambridge, England), 2011, 141(6): 759-65.
- [119] HULAS-STASIAK M, GAWRON A. Follicular atresia in the prepubertal spiny mouse (*Acomys cahirinus*) ovary [J]. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 2011, 16(10): 967-75.
- [120] SONG Z, YU H, WANG P, et al. Germ cell-specific Atg7 knockout results in primary ovarian insufficiency in female mice [J]. *Cell death & disease*, 2015, 6(e1589).
- [121] PATIÑO L, BEAU I, CARLOSAMA C, et al. New mutations in non-syndromic primary ovarian insufficiency patients identified via whole-exome sequencing [J]. *Human reproduction* (Oxford, England), 2017, 32(7): 1512-20.
- [122] DELCOUR C, AMAZIT L, PATINO L, et al. ATG7 and ATG9A loss-of-function variants trigger autophagy impairment and ovarian failure [J]. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 2019, 21(4): 930-8.
- [123] KABEYA Y, MIZUSHIMA N, YAMAMOTO A, et al. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation [J]. *Journal of cell science*, 2004, 117(2805-12).
- [124] HUANG T, REN J, ZHANG Q, et al. IGFBR1 accelerates autophagy and activation of hepatic stellate cells via mutual regulation between H19 and PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 2019, 116(109034).
- [125] XU K, HE Y, MOQBEL S, et al. SIRT3 ameliorates osteoarthritis via regulating chondrocyte autophagy and apoptosis through the PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *International journal of biological macromolecules*, 2021, 175(351-60).
- [126] ZHANG M, LIU S, CHUA M, et al. SOCS5 inhibition induces autophagy to impair metastasis in hepatocellular carcinoma cells via the PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Cell death & disease*, 2019, 10(8): 612.
- [127] FLORES K, YADAV S, KATZ A, et al. The Nuclear Translocation of Mitogen-Activated Protein Kinases: Molecular Mechanisms and Use as Novel Therapeutic Target [J]. *Neuroendocrinology*, 2019, 108(2): 121-31.
- [128] HANYU X, LANYUE L, MIAO D, et al. Effect of Ganoderma applanatum polysaccharides on

- MAPK/ERK pathway affecting autophagy in breast cancer MCF-7 cells [J]. *International journal of biological macromolecules*, 2020, 146(353-62).
- [129] XU Y, SUN Q, YUAN F, et al. RND2 attenuates apoptosis and autophagy in glioblastoma cells by targeting the p38 MAPK signalling pathway [J]. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 2020, 39(1): 174.
- [130] LI Y, LIU Y, ZHOU X, et al. Let-7e modulates the proliferation and the autophagy of human granulosa cells by suppressing p21 signaling pathway in polycystic ovary syndrome without hyperandrogenism [J]. *Molecular and cellular endocrinology*, 2021, 535(111392).
- [131] LI Y, ZHANG J, LIU Y, et al. TUG1 Long non-coding RNA and its molecular mechanisms in polycystic ovary syndrome [J]. *RNA biology*, 2020, 17(12): 1798-810.
- [132] BEHREND S, SOWA M, GYGI S, et al. Network organization of the human autophagy system [J]. *Nature*, 2010, 466(7302): 68-76.
- [133] RABINOWITZ J, WHITE E. Autophagy and metabolism [J]. *Science (New York, NY)*, 2010, 330(6009): 1344-8.
- [134] GONZALEZ C, RESNIK R, VACCARO M. Secretory Autophagy and Its Relevance in Metabolic and Degenerative Disease [J]. *Frontiers in endocrinology*, 2020, 11(266).
- [135] ZHOU J, PENG X, MEI S. Autophagy in Ovarian Follicular Development and Atresia [J]. *International journal of biological sciences*, 2019, 15(4): 726-37.
- [136] CHOI J, JO M, LEE E, et al. The role of autophagy in follicular development and atresia in rat granulosa cells [J]. *Fertility and sterility*, 2010, 93(8): 2532-7.
- [137] GAWRILUK T, KO C, HONG X, et al. Beclin-1 deficiency in the murine ovary results in the reduction of progesterone production to promote preterm labor [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(40): E4194-203.
- [138] ZHOU J, YAO W, LIU K, et al. MicroRNA let-7g regulates mouse granulosa cell autophagy by targeting insulin-like growth factor 1 receptor [J]. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2016, 78(130-40).
- [139] XIE Q, WANG M, CAO Z, et al. Melatonin protects against excessive autophagy-induced mitochondrial and ovarian reserve function deficiency through ERK signaling pathway in Chinese hamster ovary (CHO) cells [J]. *Mitochondrion*, 2021, 61(44-53).
- [140] WU C, CHEN C, DAI J, et al. Toll pathway modulates TNF-induced JNK-dependent cell death in *Drosophila* [J]. *Open biology*, 2015, 5(7): 140171.
- [141] KITANAKA C, SATO A, OKADA M. JNK Signaling in the Control of the Tumor-Initiating Capacity Associated with Cancer Stem Cells [J]. *Genes & cancer*, 2013, 4(388-96).
- [142] GAO G, MA J, LU P, et al. Ophiopogonin B induces the autophagy and apoptosis of colon cancer cells by activating JNK/c-Jun signaling pathway [J]. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 2018, 108(1208-15).
- [143] ZHANG L, BAO H, XU Y, et al. Phanginin R Induces Cytoprotective Autophagy via JNK/c-Jun Signaling Pathway in Non-Small Cell Lung Cancer A549 Cells [J]. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, 2020, 20(8): 982-8.
- [144] CAO Y, SHEN M, JIANG Y, et al. Melatonin reduces oxidative damage in mouse granulosa cells via restraining JNK-dependent autophagy [J]. *Reproduction (Cambridge, England)*, 2018, 155(3): 307-19.
- [145] GAO H, LIN L, HAQ I, et al. Inhibition of NF- κ B promotes autophagy via JNK signaling pathway in porcine granulosa cells [J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 2016, 473(1): 311-6.
- [146] LI X, LI X, WANG J, et al. Oridonin up-regulates expression of P21 and induces autophagy and apoptosis in human prostate cancer cells [J]. *International journal of biological sciences*, 2012, 8(6): 901-12.
- [147] MOHAPATRA P, PREET R, DAS D, et al. Quinacrine-mediated autophagy and apoptosis in colon cancer cells is through a p53- and p21-dependent mechanism [J]. *Oncology research*, 2012, 20(81-91).
- [148] LIU Q, RUAN F, LI J, et al. β Human Menstrual Blood-Derived Stem Cells Inhibit the Proliferation of HeLa Cells via TGF-1-Mediated JNK/P21 Signaling Pathways [J]. *Stem cells international*, 2019, 2019(9280298).

参考文献

- [149] LIANG Y, ZHENG L, WU Y, et al. RASSF6 promotes p21(Cip1/Waf1)-dependent cell cycle arrest and apoptosis through activation of the JNK/SAPK pathway in clear cell renal cell carcinoma [J]. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*, 2014, 13(9): 1440-9.
- [150] CHOI J, JO M, LEE E, et al. Induction of apoptotic cell death via accumulation of autophagosomes in rat granulosa cells [J]. *Fertility and sterility*, 2011, 95(4): 1482-6.

中英文对照缩略表

(Abbreviation Index)

英文缩写	英文全称	中文全称
AFC	Antral Follicle Counting	窦卵泡计数
AMH	Anti-Müllerian Hormone	抗苗勒氏管激素
ART	Assisted Reproductive Technology	辅助生殖技术
AUC	Area Under the Curve	曲线下面积
ATG	Autophagy-related	自噬相关
ASRM	American Society for Reproductive Medicine	美国生殖医学学会
BMI	Body Mass Index	身体质量指数
bPOI	Biochemical Premature Ovarian Insufficiency	生化异常期早发性卵巢功能不全
circRNA	Circular RNA	环状 RNA
COH	Controlled Ovarian Hyperstimulation	控制性超排卵
CQ	Chloroquine	氯喹
DOR	Diminished Ovarian Reserve	卵巢储备功能减退
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	二甲基亚砜
E ₂	Estradiol	雌二醇
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid	乙二胺四乙酸
FSHR	Follicle Stimulating Hormone Receptor	卵泡刺激素受体
FISH	Fluorescence in situ Hybridization	荧光原位杂交
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
HRT	Hormone Replacement Therapy	激素替代治疗

中英文对照缩略表

hLGC	Human Luteinized Granulosa Cell	人黄素化颗粒细胞
IVF-ET	In vitro Fertilization-Embryo Transfer	体外受精-胚胎移植
ICSI	Intracytoplasmic Sperm Injection	卵母细胞浆内单精子注射
JNK	c-Jun N-Terminal Kinase	c-Jun 氨基末端激酶
LncRNA	Long noncoding RNA	长链非编码 RNA
LC3B	Microtubule Associated Protein 1 Light Chain 3B	微管相关蛋白轻链 3B
miRNA	MicroRNA	微小 RNA
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase	丝裂原激活的蛋白激酶
MOI	Multiplicity of Infection	感染复数
OD	Optical Density	光密度吸收
POF	Premature Ovarian Failure	卵巢早衰
p-ERK	Phosphorylated Extracellular Regulated Protein Kinase	磷酸化细胞外调节蛋白激酶
p38 MAPK	p38 Mitogen-activated Protein Kinase	p38 丝裂原激活的蛋白激酶
PCOS	Polycystic Ovary Syndrome	多囊卵巢综合征
PBS	Phosphate Buffered Saline	磷酸盐缓冲液
qRT-PCR	Quantitative Real Time PCR	实时荧光定量PCR
ROC curve	Receiver Operator Characteristic Curve	受试者工作特征曲线
SD	Standard Deviation	标准差
siRNA	Small interfering RNA	小干扰RNA
SPSS	Statistical Package for Social Science	社会科学统计学软件包