

## • 基础研究 •

## MicroRNA-26b 靶向 FOXO1 调控人颗粒细胞 KGN 凋亡的研究

何遐娜 刘小梅 刘凌瑜

**【摘要】目的** 探讨 MicroRNA-26b (miR-26b) 和转录因子叉头框蛋白 O1 (FOXO1) 对人颗粒细胞 KGN 凋亡的影响, 并初步探讨其潜在的作用机制。**方法** 将人颗粒细胞 KGN 作为研究对象, 分为 miR-26b 过表达组及过表达对照组、miR-26b 抑制剂组及抑制剂对照组、FOXO1 特异性干扰 RNA 组 (FOXO1-siRNA 组) 及 FOXO1 特异性干扰 RNA 对照组 (FOXO1-siRNA NC 组)、miR-26b 抑制剂和 FOXO1-siRNA 共转染组, Real-time PCR 检测 miR-26b 转染率、FOXO1 转染率, 双荧光素酶报告基因检测 miR-26b 与 FOXO1 3'UTR 的靶向关系, 流式细胞术检测细胞凋亡情况, Western blot 检测 FOXO1、胰岛素生长因子 1 受体 (IGF-1R)、胰岛素受体底物 1 (IRS1)、胰岛素受体底物 2 (IRS2)、磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K) 的蛋白表达水平。**结果** 双荧光素酶基因检测报告证实 miR-26b 与 FOXO1 存在靶向关系。流式细胞术显示: miR-26b 过表达组早期凋亡率为  $(4.58 \pm 0.59)\%$ , 高于过表达对照组  $(2.78 \pm 0.43)\%$  和 miR-26b 抑制剂组  $(3.41 \pm 0.39)\%$  ( $P$  均  $< 0.05$ ); miR-26b 抑制剂组与抑制剂对照组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); FOXO1-siRNA 组颗粒细胞 KGN 细胞早期凋亡率升高, 且高于 miR-26b 过表达组 ( $P$  均  $< 0.01$ ); miR-26b 抑制剂和 FOXO1-siRNA 共转染组的凋亡率高于 miR-26b 抑制剂组 ( $P < 0.05$ )。蛋白免疫印迹实验显示: 与 FOXO1-siRNA NC 组相比, FOXO1-siRNA 组中 FOXO1 和 PI3K 蛋白表达水平下降, IGF-1R、IRS1、IRS2 蛋白表达水平增高 ( $P < 0.05$ )。**结论** miR-26b 通过靶向 FOXO1 调控人颗粒细胞 KGN 的凋亡, 可能与 IGF-1R/PI3K 信号通路相关。

**【关键词】** miR-26b; 转录因子叉头框蛋白 O1; 细胞凋亡; 多囊卵巢综合征

**【中图分类号】** R711.75 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2024)08-0071-04

多囊卵巢综合征 (PCOS) 是女性生殖内分泌紊乱的一种常见病, 在我国患有 PCOS 的育龄期女性从 2010 年的 5.61% 增加到 2020 年的 8.6%, 患病人数之多不容忽视<sup>[1-2]</sup>。PCOS 临床表现为无排卵或稀发排卵, 是导致女性不孕的主要原因; 远期出现子宫内膜癌的风险较健康女性增加 2~6 倍<sup>[3]</sup>。因此, 恢复 PCOS 自主排卵, 是其临床治疗的关键点及难点。miR-26b 可能通过影响颗粒细胞的凋亡促使卵泡闭锁, 与 PCOS 的异常卵泡之间存在密切联系<sup>[4]</sup>。转录因子叉头框蛋白 O1 (FOXO1) 可能在 PCOS 女性卵巢颗粒细胞的增殖或凋亡中发挥作用<sup>[5]</sup>。研究发现 miRNA 可通过下调 FOXO1 抑制细胞增殖, 促进细胞凋亡, 但具体信号转导机制并不清楚。因此, 本研究从细胞水平上探索 miR-26b 和 FOXO1 对人颗粒细胞株 KGN 凋亡的调控作用, 及 miR-26b、FOXO1 之间的靶向作用关系, 分析 miR-26b 导致 PCOS 卵泡闭锁的可能机制。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞及主要试剂** 人颗粒细胞 KGN (武汉普诺赛生物技术有限公司)、胎牛血清 (赛业)、DMEM 高糖培养基 (美国 HyClone)、sybr green 荧光染料、HighGene 转染试剂 (武汉爱博泰克生物技术有限公司)、TransZol 总 RNA 提取试剂、实时定量 PCR 试剂盒、细胞转染试剂盒、细胞凋亡检测试剂盒、双荧光检测试剂盒 (北京全式金生物)。

**1.2 主要仪器** CO<sub>2</sub> 培养箱 (CIB-191C, 美国精骐有限公司), 荧光倒置显微镜 (MIF-BGU-BP-20, 广州市明美光电技术有限公司), NovoCyte® 流式细胞仪 (NovoCyte 1030, 艾森生物), 荧光定量 PCR 仪 (QuantStudio 3, ABI), ChemiScope Touch 荧光发光成像仪 (6100, 上海勤翔科学仪器有限公司), 全波长酶标仪 (SPECTRO Star, Bio-Medical Technology Solutions Inc)。

**基金项目:** 福建省自然科学基金资助项目 (2021J011319)

**作者单位:** 福建省福州市第二总医院, 福州 350007

**DOI:** 10.20148/j.fmj.2024.08.021

### 1.3 实验方法

**1.3.1 细胞培养和转染** 人卵巢颗粒细胞系 KGN 于完全培养基中培养, 于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养, 隔 1 d 换液 1 次。取对数生长期的细胞进行后续实验。转染前一天将细胞消化后铺入六孔板中, 24 h 后待细胞融合度达到 70%~90% 时即可开始转染, 分为 miR-26b 过表达组及过表达对照组、miR-26b 抑制剂组及抑制剂对照组、FOXO1 特异性干扰 RNA 组 (FOXO1-siRNA 组) 及 FOXO1 特异性干扰 RNA 对照组 (FOXO1-siRNA NC 组)、miR-26b 抑制剂和 FOXO1-siRNA 共转染组按 HighGene 转染试剂说明书进行转染。细胞转染 48 h 后, 收集细胞, 进行实时荧光定量核酸扩增检测。

**1.3.2 Real-time PCR 检测 mRNA 表达水平** 收集各组细胞, 根据 RNA 提取试剂盒提取细胞 miRNA 和总 RNA, 保存样本于 -70 ℃ 以备长期使用。以 RNA 为模板, 使用逆转录试剂盒, 42 ℃ 孵育 15 min, 85 ℃ 灭活 5 s, 得到互补 DNA。将互补 DNA 倍比稀释到总体积 20 μL, 在 95 ℃ 变性 5 s、60 ℃ 退火 30 s 中循环 40 个, 最后使用 2<sup>-ΔΔCT</sup> 法荧光定量检测 miR-26b。引物序列见表 1, 内参为 U6 和 GAPDH。

表 1 PCR 引物序列

引物名称	引物序列 (5'-3')
miR-26b-F	GCGCCTGTTCTCCATTACTTGGCT
U6-F (homo)	CTCGCTTCGGCAGCACA
FOXO1-F (homo)	GCCTGACCCAAGTGAAGACA
FOXO1-R (homo)	CCATTCTGCCATAGCCATTGC
GAPDH-F (homo)	GGTGTAACCATGAGAAGTATGA
GAPDH-R (homo)	GAGTCTTCCACGATACCAAAAG

**1.3.3 流式细胞术检测细胞凋亡** 将收集完的单个细胞悬浮液以 300 g 离心 5 min, 加入预冷 PBS 漂洗, 离心后收集细胞, 加入 Annexin V-FITC/PIA (5 μL/10 μL), 反应 10~15 min, 加入 400 μL 细胞培养缓冲液重悬, 放置冰上, 上机检测。

**1.3.4 Luciferase 检测 miR-26b 与 FOXO1 3'UTR 的相互作用** 利用 TargetScan、JASPAR 等网站查询并预测 miR-26b-3p 与 FOXO1 3'UTR 结合位点。取对数生长期的 KGN 细胞于 37 ℃ 培养箱中培养 24 h。取 5 μL 培养基稀释过表达 miR-26b, 构建载体, Lipo6000 转染剂转染, 静置 5 min, 然后构建

相应的质粒。按照 Lipofectamine™2000 试剂操作, 将载体和 miR-26b mimic 或 NC mimic 片段共转染, 转染 48 h 后, 使用多功能酶标仪检测荧光值并计算比值。

**1.3.5 Western blot 检测蛋白表达水平** 收集细胞, 分为 FOXO1-siRNA 组、FOXO1-siRNA NC 组, 4 ℃ 离心 10 min 抽提细胞总蛋白, 读取各孔灰度值, 根据 BCA 结果进行电泳, 将蛋白转移至 PVDF 膜, 室温封闭 2 h, 分别加入 FOXO1 一抗 (1:1 000)、PI3K 一抗 (1:1 000)、IGF-1R 一抗 (1:1 000)、IRS1 一抗 (1:1 000)、IRS2 一抗 (1:1 000), TBST 洗涤 3 次各 5 min, 加入二抗 (1:5 000) 常温孵育 1h, 洗涤, 分析目标蛋白 FOXO1、胰岛素生长因子 1 受体 (IGF-1R)、胰岛素受体底物 1 (IRS1)、胰岛素受体底物 2 (IRS2)、磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K) 的蛋白表达水平, 以 β-actin 作为内参。

**1.4 统计学分析** 数据分析应用 SPSS 22.0 软件计算, 采用  $\bar{x} \pm s$  表示实验数据, 多组间比较采用单因素方差分析, 非参数检验分析不符合正态分布的多组间比较。P<0.05 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 miR-26b mRNA 转染率** miR-26b 过表达组的转染率为 [(108.646±35.587)%], 较过表达对照组 [(1.019±0.229)%] 高 (P<0.01); miR-26b 抑制剂对照组 [(1.003±0.091)%]、miR-26b 抑制剂组 [(0.206±0.009)%] 转染率均下降 (均 P<0.01)。

**2.2 FOXO1-siRNA 转染率** FOXO1-siRNA 组 mRNA 转染率为 [(0.371±0.157)%], 低于 FOXO1-siRNA NC 组 [(1.014±0.211)%] (P<0.01), 说明合成的 FOXO1-siRNA 具有较好的干扰效果。

**2.3 miR-26b 靶向调控 FOXO1** 双荧光素酶报告基因检测证实, 对于 FOXO1 野生型, miR-26b 过表达组荧光酶活性为 (0.147±0.008), 低于过表达对照组 (0.999±0.006) (P<0.01), 而 FOXO1 突变型, miR-26b 过表达组荧光酶活性为 (1.000±0.003) 与过表达对照组 (1.000±0.029) 差异无统计学意义 (P>0.05)。表明 hsa-miR-26b 对 FOXO1 3'UTR 具有抑制作用, 其作用靶点是 FOXO1。

**2.4 流式细胞仪检测 KGN 细胞凋亡结果** miR-

26b 过表达组早期凋亡率高于过表达对照组 ( $P < 0.01$ )。miR-26b 抑制剂组与抑制剂对照组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )，miR-26b 过表达组早期细胞凋亡率高于抑制剂组 ( $P < 0.05$ )。干扰 FOXO1 后颗粒细胞 KGN 细胞早期凋亡率升高，且高于 miR-26b 过表达组 ( $P < 0.01$ )。另外，为了进一步确认 miR-26b 是通过 FOXO1 来调控人颗粒细胞 KGN 凋亡，将 miR-26b 抑制剂和 FOXO1-siRNA 共转染 KGN 细胞。与 miR-26b 抑制剂组相比，miR-26b 抑制剂和 FOXO1-siRNA 共转染组的细胞早期凋亡率升高 ( $P < 0.05$ )，说明 miR-26b 可通过 FOXO1 调控颗粒细胞 KGN 的凋亡。见表 2。

**2.5 下调 FOXO1 对 KGN 细胞中 IGF-1R/PI3K 蛋白的影响** 与 FOXO1-siRNA NC 组相比，FOXO1-siRNA 组中 FOXO1 和 PI3K 白表达水平明显下降，IGF-1R、IRS1、IRS2 表达水平增加 ( $P < 0.01$ )。结果表明下调 FOXO1 可抑制 KGN

细胞的 FOXO1 和 PI3K 蛋白表达，促进 IGF-1R、IRS1、IRS2 表达 (表 3)。

表 2 各组细胞凋亡率 (%， $\bar{x} \pm s$ )

组别	PI	FITC	PI+FITC
过表达对照组	1.56±0.56	2.63±0.42	2.78±0.43
miR-26b 过表达组	2.19±0.36	9.55±1.63	4.58±0.59 <sup>①</sup>
抑制剂对照组	2.21±0.85	2.49±0.21	2.97±0.81
miR-26b 抑制剂组	2.01±0.72	2.78±0.72	3.41±0.39 <sup>②③</sup>
FOXO1-siRNA NC 组	2.14±0.63	2.46±1.09	2.63±0.41
FOXO1-siRNA 组	7.06±0.43	1.52±0.79	7.10±1.18 <sup>④⑤</sup>
miR-26b 抑制剂和 FOXO1-siRNA 共转染组	6.82±1.24	2.96±1.55	8.34±0.67 <sup>⑥</sup>

注：①miR-26b 过表达组与过表达对照组比较， $P < 0.01$ ；②miR-26b 抑制剂组与抑制剂对照组比较， $P > 0.05$ ；③miR-26b 过表达组与 miR-26b 抑制剂组相比， $P < 0.05$ ；④FOXO1-siRNA 组与 FOXO1-siRNA NC 组比较， $P < 0.01$ ；⑤miR-26b 过表达组与 FOXO1-siRNA 组比较， $P < 0.01$ ；⑥miR-26b 抑制剂和 FOXO1-siRNA 共转染组与 miR-26b 抑制剂组比较， $P < 0.01$ 。

表 3 各组细胞蛋白表达水平 (灰度值， $\bar{x} \pm s$ )

组别	FOXO1	IGF-1R	IRS1	IRS2	PI3K
FOXO1-siRNA NC 组	0.92±0.03	0.82±0.04	0.69±0.04	0.75±0.06	0.97±0.03
FOXO1-siRNA 组	0.57±0.02	1.00±0.05	0.94±0.03	1.02±0.07	0.60±0.04
<i>t</i> 值	16.182	-4.898	-8.541	-5.492	12.913
<i>P</i> 值	<0.001	0.008	0.001	0.006	<0.001

### 3 讨论

PCOS 由于排卵异常，是导致育龄女性不孕的重要原因之一。卵泡发育的命运由颗粒细胞的增殖和凋亡决定，颗粒细胞凋亡增加、增殖率降低及功能紊乱会引起卵泡闭锁，导致排卵异常，与 PCOS 的发生机制密切相关<sup>[6]</sup>。miRNA 通过多种通路或靶向基因参与卵巢颗粒细胞的生物学活动，比如 miR-93-5p 调控信号通路来促进卵巢颗粒细胞增殖，进而促进 PCOS 的发生发展<sup>[7]</sup>。Lin 等<sup>[8]</sup>通过检测猪卵巢中 miR-26b 表达水平，发现其在卵泡闭锁中表达上升。为探索 miR-26b 能否通过影响颗粒细胞的凋亡促使卵泡闭锁，有研究者通过建立大鼠 PCOS 模型，在大鼠卵巢颗粒细胞移入 miR-26b 质粒，发现颗粒细胞凋亡率明显升高，提示 miR-26b 促进细胞凋亡，参与 PCOS 发病<sup>[9]</sup>。本研究结果提示，miR-26b 过表达组早期凋亡率高于阴性对照组及抑制剂组，与上述结果一致。说明 miR-26b 促进颗粒细胞凋亡。然而，miR-26b 在 PCOS 中对颗粒细胞的凋亡的调控机制尚不清楚。

FOXO1 可能在 PCOS 女性卵巢颗粒细胞的增殖或凋亡中发挥作用，因其为抗凋亡基因，能够与多种因子构成一个精确、复杂的调控网络，导致卵泡发育异常<sup>[10]</sup>。研究发现 miRNA 可通过下调 FOXO1 抑制细胞增殖，促进细胞凋亡，但具体信号转导机制并不清楚。Xu 等<sup>[11]</sup>研究发现 miR-26b 的靶基因主要富集在凋亡、PI3K-Akt、FOX 和 TGF-β 等信号通路中。本研究通过双荧光素酶报告实验验证了 miR-26b 与 FOXO1 有直接靶向关系。为进一步验证 FOXO1 对颗粒细胞 KGN 凋亡的影响，干扰 FOXO1 后颗粒细胞 KGN 细胞凋亡率升高，且高于 miR-26b 过表达组，表明下调 FOXO1 可促进 KGN 细胞的凋亡。

FOXO1 通过 IGF-1R/PI3K 信号通路在卵泡的发育、闭锁和颗粒细胞的增殖及凋亡、黄体化等发挥重要作用<sup>[12]</sup>。李丽华等<sup>[13]</sup>收集 100 例 PCOS 病例，发现 IGF-1 表达升高。IGF-1 能在 PCOS 患者中出现过度作用，抑制卵巢中优势卵泡发育，导致卵泡闭锁<sup>[14]</sup>。IGF-1 与 IGF-1R 结合，激活酪氨酸

激酶活性, 出现构象改变, 激活 IRS1 和 IRS2, 启动通路信号转导。有研究者构建不同表型的 PCOS 小鼠模型, 分别有不孕、肥胖、卵巢功能障碍等, 发现 IGF-1R 的表达水平均有不同程度升高<sup>[15]</sup>。PI3K 信号通路在多种细胞功能中发挥调节作用, 比如参与细胞增殖、凋亡及分化等, 通过调控颗粒细胞的增殖、卵泡发育及胰岛素抵抗等, 在 PCOS 的疾病发展中起着重要作用<sup>[16]</sup>。研究发现, PCOS 患者颗粒细胞中 IGF-1R/PI3K 信号通路过度激活, IGF-1R、IRS1、IRS2 明显升高, 而 FOXO1 表达水平明显降低<sup>[17]</sup>。

本研究中证实 miR-26b 与 FOXO1 的存在靶向关系, 过表达 miR-26b 及下调 FOXO1 均能促进颗粒细胞凋亡。通过干扰颗粒细胞 KGN 中 FOXO1 的表达发现: FOXO1 和 PI3K 蛋白表达水平明显下降, IGF-1R、IRS1、IRS2 表达水平增加, 提示 FOXO1 能够调控 IGF1R/PI3K 信号通路的激活。为进一步研究 miR-26b 通过靶向 FOXO1 调控 IGF-1R/PI3K 信号通路影响卵巢颗粒细胞的凋亡, 将 miR-26b 抑制剂和 FOXO1-siRNA 共转染 KGN 细胞, 与 miR-26b 抑制剂组相比, miR-26b 抑制剂和 FOXO1-siRNA 共转染组的细胞早期凋亡率升高, 揭示 miR-26b 通过靶向 FOXO1 调控人颗粒细胞 KGN 的凋亡, 该过程可能与 IGF-1R/PI3K 信号通路相关。miR-26b 和 FOXO1 可能成为 PCOS 潜在治疗靶点。然而本研究尚存在不足之处, miR-26b 与 FOXO1 未在体内水平上探讨其在 PCOS 作用机制, 待将来进一步研究。

#### 参考文献

- [1] LIU J, WU Q, HAO Y, et al. Measuring the global disease burden of polycystic ovary syndrome in 194 countries: global burden of disease study 2017 [J]. Hum Reprod, 2021, 36 (4): 1108-1119.
- [2] YANG R, LI Q, ZHOU Z, et al. Changes in the prevalence of polycystic ovary syndrome in China over the past decade [J]. Lancet Reg Health West Pac, 2022, 25: 100494.
- [3] 李卉, 杨冬梓. 《2018 年多囊卵巢综合征评估与管理国际循证指南》之第一章(诊断及风险评估)解读 [J]. 实用妇产科杂志, 2023, 39 (2): 113-116.
- [4] NOTHNICK W B. The role of micro-RNAs in the female reproductive tract [J]. Reproduction, 2012, 143 (5): 559-576.
- [5] 杨加宁, 张立然. 沉默信息调节因子 1/叉头框蛋白 O1 信号通路调控铁死亡对多囊卵巢综合征大鼠卵巢颗粒细胞的影响实验研究 [J]. 陕西医学杂志, 2024, 53 (8): 1035-1040.
- [6] 徐秋霞, 乔岩岩. 颗粒细胞凋亡影响多囊卵巢综合征患者卵泡闭锁的研究进展 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2024, 32 (1): 214-219.
- [7] 王敬敏, 李卫, 闫佳敏, 等. 微 RNA-93-5p 对多囊卵巢综合征患者卵巢颗粒细胞增殖的影响及机制 [J]. 新乡医学院学报, 2024, 41 (6): 548-553.
- [8] LIN F, LI R, PAN ZX, et al. MiR-26b promotes granulosa cell apoptosis by targeting ATM during follicular atresia in porcine ovary [J]. PLoS One, 2012, 7 (6): e38640.
- [9] HOSSAIN M M, CAO M, WANG Q, et al. Altered expression of miRNAs in a dihydrotestosterone-induced rat PCOS model [J]. J Ovarian Res, 2013, 6 (1): 36-37.
- [10] SHEN M, LIN J, ZHANG JQ, et al. Involvement of the up-regulated FOXO1 expression in follicular granulosa cell apoptosis induced by oxidative stress [J]. J Biol Chem, 2012, 287 (31): 25727-25740.
- [11] XU H M, ZHU J H, HU C, et al. Inhibition of microRNA-181 a may suppress proliferation and invasion and promote apoptosis of cervical cancer cells through the PTEN/Akt/FOXO1 pathway [J]. J Physiol Biochem, 2016, 72 (4): 721-732.
- [12] GEBREMEDHN S. MicroRNA-183-96-182 Cluster Regulates Bovine Granulosa Cell Proliferation and Cell Cycle Transition by Coordinately Targeting FOXO1 [J]. Biology of Reproduction, 2016, 94 (6): P. 127.
- [13] 李丽华. 血清中 IGF-1 及 PI3K/Akt 信号通路在 PCOS 患者体内表达的变化及意义 [J]. 实验与检验医学, 2018, 36 (3): 333-336.
- [14] ERGENOGLU M, YILDIRIM N, YILDIRIM A G, et al. Effects of Resveratrol on Ovarian Morphology, Plasma Anti-Mullerian Hormone, IGF-1 Levels, and Oxidative Stress Parameters in a Rat Model of Polycystic Ovary Syndrome [J]. REPROD SCI, 2015, 22 (8): 942.
- [15] PRADO C L, DE ALMEIDA B C, DE JESUS S M, et al. IGF-1R and Leptin Expression Profile and the Effects of Metformin Treatment on Metabolic and Endocrine Parameters in PCOS Mice [J]. BioMed research international, 2017, 2017: 9058307.
- [16] LI T, HUI M, CHEN W, Li L, et al. Role of the PI3K-Akt Signaling Pathway in the Pathogenesis of Polycystic Ovary Syndrome [J]. Reprod Sci, 2017, 24 (5): 646-655.
- [17] 贺婷婷. 多囊卵巢综合征患者颗粒细胞中 PI3K 信号传导通路的 microRNA 调控机制 [D]. 济南: 山东大学, 2019.