

doi:10.3969/j.issn.1674-4616.2021.06.013

• 文献综述 •

外泌体 miRNA 在卵巢早衰中的研究进展*

周凡茹¹ 宋琦璠¹ 张楚¹ 刘霞¹
李凡¹ 胡茹楠¹ 黄燕靖¹ 张明敏^{2△}

华中科技大学同济医学院附属同济医院¹ 中西医结合研究所,² 中医科, 武汉 430030

关键词 外泌体; 微小 RNA; 卵巢早衰

中图分类号 R711.75 **文献标志码** A

卵巢早衰 (premature ovarian failure, POF) 是指各种原因导致的女性 40 岁以前卵巢功能病理性下降, 并伴有闭经、性腺功能减退和不孕症等疾病, 严重影响女性生殖健康。据统计^[1], POF 在 30 岁以下女性中的发病率约为 0.1%, 在 40 岁以下女性中的发病率为 1%, 其病因包括染色体异常、自身免疫因素、环境因素、心理因素和医源性因素等。目前治疗 POF 的方法主要包括激素治疗、卵母细胞和胚胎冷冻保存、卵巢组织移植和干细胞移植等, 然而这些治疗方法往往存在不同程度的治疗局限性、操作侵袭性、质量不可控性, 甚至可能产生同种异体移植的免疫反应, 并且常常涉及伦理问题等^[2]。外泌体为细胞产生的直径在 30~100 nm 的囊泡, 是细胞间信号传递及药物治疗的载体, 在肿瘤、免疫、心血管等领域已有深入研究, 但在卵巢疾病尤其是 POF 方面的研究目前仍较为有限。微小 RNA (microRNA, miRNA) 是外泌体携带的主要功能因子, 其在卵巢早衰的发生及治疗中具有重要意义。鉴于此, 本文总结了目前外泌体 miRNA 在 POF 治疗中的研究现状, 以期 POF 的治疗提供新的思路和方法。

1 外泌体的形成与作用

1.1 外泌体的形成

在最近几年的研究中, 出现了新的细胞间相互通信的机制, 即细胞外囊泡。细胞外囊泡是通过细胞脂质双层向内萌芽收缩, 形成细胞内的多囊泡体, 与细胞膜结合以钙依赖性方式释放到细胞外环境中形成的纳米级囊泡^[3]。细胞能够产生和释放不同类型的囊泡, 例如微泡、外泌体、凋亡小体和外在体, 它们的

大小、生物发生和表面标志物都不同^[4]。外泌体是细胞间通信的重要介质, 携带多种生物活性细胞因子, 包括生长因子、脂质、信使 RNA (messenger RNA, mRNA)、长链非编码 RNA (long noncoding RNA, lncRNA) 和 miRNA 等^[5-6]。几乎所有的细胞均能够产生外泌体, 并且在体液中也有大量存在, 例如血液、唾液、尿液、母乳、羊水中, 还可从腹腔积液、卵泡液中分离得出^[7]。不同细胞来源的外泌体所含 RNA、蛋白质和脂质均有所差异, 功能也不尽相同^[8]。

1.2 外泌体的作用

外泌体在细胞间发挥重要的通信作用^[9], 并具有多种属性, 例如转运蛋白质、遗传物质、非水溶性分子等, 并具有膜穿透能力、载药能力和长循环半衰期等^[10]。基于外泌体产生细胞的生理环境变化, 外泌体的数量及特征亦可发生变化^[11]。这些特性给外泌体的应用带来了一定的稳定性及可变性, 一方面外泌体能够继承其产生细胞的一定生物学特征; 另一方面, 根据所产生细胞的环境变化, 外泌体携带的生物学特性也会发生部分改变。此外, 有研究表明, 外泌体具有较长的循环半衰期, 无免疫原性^[12], 具有较高溶解度和生物利用度^[13], 能够耐受低 pH 值^[14] 和高温环境, 这些属性对于将外泌体用作药物输送载体是十分重要的。

外泌体在正常生理状态下广泛参与组织再生、免疫监视、血液循环和干细胞重塑等过程^[15], 并且在疾病发病机理中也具有关键作用。外泌体复杂的生物发生及生物学特征反映了亲代细胞内部的分子加工过程, 最适合用作体液中该亲代细胞的潜在替代物^[16], 因此广泛用于临床诊断和治疗开发。

目前的研究^[17-18] 结果显示, 外泌体主要通过 3 种可能机制参与细胞通信并发挥作用: 第一, 外泌体的膜蛋白可以与靶细胞中的受体相互作用并激活细胞

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 81774090)

△ 通信作者, Corresponding author, E-mail: mmzhang@tjhu. tjmu. edu. cn

内信号传导;第二,外泌体膜蛋白的裂解片段可以作为配体,与靶细胞表面受体结合,从而激活靶细胞内的信号级联;第三,外泌体与靶细胞膜融合,以非选择性方式释放其内含物,从而导致信号传导的激活。

1.3 外泌体 miRNA 的作用

在外泌体运载的生物分子中,miRNA 的作用受到越来越多的关注,miRNA 是长度约为 20~24 个核苷酸的非编码 RNA,这些小分子与靶标 mRNA 结合,可以导致翻译的抑制和/或 mRNA 降解,异常的 miRNA 表达与多种人类疾病有关,例如癌症、心血管疾病、炎症疾病和妇科疾病^[19]。生殖系统中 miRNA 的表达水平与女性的生育能力以及胚胎发育能力密切相关^[20]。miRNA 通过转录抑制或降解来调控基因表达,在卵母细胞成熟和卵泡形成过程中发挥重要作用^[21]。

2 外泌体 miRNA 对卵巢早衰不同环节的调控

卵巢卵泡是一个由内分泌、旁分泌和自分泌信号精密调控的相对独立单位,卵巢卵泡的生长和成熟过程涉及广泛的细胞间通信,包括体细胞(卵泡膜细胞、颗粒细胞、卵丘细胞)间、体细胞与卵母细胞间。研究者^[22]对卵泡中的主要成分卵泡液进行研究分析,发现其富含多种来源的外泌体,并且在介导哺乳动物卵泡内的细胞通信中起着前所未有的作用。

2.1 外泌体 miRNA 与颗粒细胞功能

颗粒细胞是卵泡主要的细胞类型,它们支持卵泡的形成和发育,并具有分泌促性腺激素以维持卵巢功能的作用,是维持卵泡正常发育的关键。卵泡闭锁是 POF 的一个重要特征,主要是由卵泡细胞的凋亡,尤其是颗粒细胞的凋亡引起的^[23]。

多个研究结果表明,外泌体可以通过调节磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphoinositide 3-kinase,PI3K)途径来改善卵巢功能。Yang 等^[24]通过对骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells,BMSCs)来源的外泌体进行研究发现,其携带的 miR-144-5p 能够靶向抑制第 10 号染色体同源缺失性磷酸酶张力蛋白基因(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten,PTEN),从而上调 PI3K/AKT 通路来促进化疗后的卵巢卵泡恢复。Santonocito 等^[25]研究也显示,在卵泡液来源的外泌体中,高表达的 miR132、miR212、miR214 能够靶向 PTEN 沉默,从而激活 AKT 打开 PI3K 信号传导途径。

Huang 等^[26]研究结果显示人脂肪间充质干细胞(human adipose mesenchymal stem cells,HAMSCs)来源的外泌体可通过激活 SMAD 通路来抑制 Fas/

FasL、caspase-3 和 caspase-8 的表达,并且可以在体内和体外增加 SMAD2、SMAD3 和 SMAD5 的 mRNA 和蛋白质表达,从而促进颗粒细胞的增殖并抑制其凋亡,改善卵巢功能不全小鼠的卵巢功能。

在一项顺铂诱导 POF 的实验^[27]中发现,人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells,HUMSCs)来源的外泌体可显著上调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,下调凋亡蛋白 c-caspase-3 的表达,表明 HUMSCs 来源的外泌体对顺铂诱导的卵巢颗粒细胞凋亡亦具有保护作用。该研究者还对 HUMSCs 来源的外泌体携带的 miRNA 进行了实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 阵列分析,并预测 miRNA-24、miRNA-106a、miRNA-19b 和 miRNA-25 可能与细胞凋亡密切相关。在另一项研究中,Sang 等^[28]鉴定出存在于微泡和人卵泡液上清液中的 miRNA-24 能调节雌二醇浓度和孕酮浓度,这表明高表达的 miRNA-24 可靶向于生殖、内分泌和代谢过程中相关基因。外泌体对于卵巢颗粒细胞类固醇合成的调节作用在 Vashisht 等^[29]研究中也印证,其结果表明从姜黄素处理过的颗粒细胞培养基中提取的外泌体能够阻止水牛颗粒细胞中脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)抑制的 Cyp19A1 表达和 17 β -雌二醇生成。

基于上述研究,我们发现外泌体对于卵巢颗粒细胞的调控主要表现在两个方面,即颗粒细胞自身的增殖凋亡和颗粒细胞的类固醇合成功能。其调控的差异可能受到外泌体来源的影响,并根据其携带的不同 miRNA 而产生不同的调控作用。

2.2 外泌体 miRNA 与卵巢血管形成

血管形成是女性生殖系统正常运作和成功实现妊娠的重要过程^[30]。卵巢功能取决于复杂血管系统的建立和持续重塑,正常的血管网络是供给卵泡和黄体充足氧气、营养和激素的必要条件^[31],因此,血管形成对于卵泡发育、优势化及排卵至关重要。

血管生成是涉及血管形成细胞与细胞外环境之间相互作用的复杂生物过程,而 miRNA 是内皮细胞功能的关键调节剂,尤其是血管生成的重要调节剂^[32]。目前,外泌体对于血管形成相关调控机制已有深入研究。在一项将人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells,HUVEC)进行体外培养实验中,Gong 等^[33]验证了间充质干细胞(mesenchymal stem cells,MSC)的条件培养基具有促血管生成能力,并发现 MSC 衍生的外泌体能够携带各种促血管生成相关的 miRNA,并将这些 miRNA 转移至内

皮细胞,从而促进血管生成;外泌体携带的 miR-30b 可能通过抑制 DLL4 表达,从而在 MSC 介导的血管生成中起重要作用。类似的结果在 Liang 等^[34]的研究中也被发现,他们的研究表明,HAMSCs 来源的外泌体在体外和体内均可增强内皮细胞血管形成,其富含的 miR-125a 可转移到内皮细胞中,并通过直接抑制 DLL4 来促进尖端细胞的特异性。此外,Zhang 等^[35]在对人羊膜上皮细胞(human amniotic epithelial cells,HAECs)来源的外泌体进行研究发现,其能够抑制化疗诱导 POF 模型中的急性血管损伤,从而保护卵巢血管免受损害。

外泌体对于血管形成的调控作用还可能会受到外泌体产生环境的影响。Wang 等^[36]研究发现,2 型糖尿病模型心肌细胞的外泌体和健康心肌细胞的外泌体均包含促血管生成的 miR-126 和抗血管生成的 miR-320,但其中包含的 miRNA 数量却有所不同,健康心肌细胞组的外泌体比 2 型糖尿病模型组的外泌体具有更高水平的 miR-126 和更低水平的 miR-320,这可能部分导致了 2 组中完全相反的血管形成作用。这个结果提示,外泌体 miRNA/蛋白质的组成可以是动态变化的,并取决于细胞/组织的生理/病理状况。

2.3 外泌体 miRNA 与卵巢微环境

氧化应激是引起细胞衰老的主要原因之一,暴露于有毒物质和电离辐射均可导致氧化应激的发生^[37-38]。氧化应激在 POF 发病机理中的作用虽未得到深入研究,但已有结果^[39]显示卵巢氧化应激是原始卵泡加速衰竭的原因。

研究^[40]表明,核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid-2-related factor 2,Nrf2)作为氧化还原敏感的转录因子,在保护生物体免受各种氧化剂及有毒物质损伤中起着重要作用。Kahroba 等^[41]发现,外泌体携带的 Nrf2 及其介导产物可调节靶细胞抗氧化水平,从而诱导组织修复和再生。在一项用过氧化氢培养颗粒细胞诱导氧化应激实验中,Saeed-Zidane 等^[42]发现颗粒细胞来源的外泌体含有 Nrf2 mRNA,该 mRNA 可激活其他细胞特别是卵母细胞中的抗氧化信号通路,从而抵抗氧化应激环境。此外,人类胚胎干细胞(human embryonic stem cell,HESCs)衍生的外泌体能够恢复内皮细胞的衰老及其增殖迁移和血管形成能力,这种机制可能是通过 miR-200a 在 HESCs 衍生的外泌体中高度富集,并下调负调控 Nrf2 表达的 Keap1,从而在其介导的血管再生中发挥关键作用^[43]。

Ding 等^[44-45]研究揭示了 HAECs 来源的外泌体

miR-320a 和 HUMSCs 来源的外泌体 miRNA-17-5p,分别能够靶向下调 SIRT4 和 SIRT7 及下游相关基因表达水平,从而降低卵巢内活性氧(reactive oxygen species,ROS)积累,减少细胞凋亡并抑制细胞衰老的发生。靶向 ROS 产生和诱导抗氧化反应是克服衰老的前景治疗策略,外泌体 miRNA 在其中的作用仍有很多未知途径,仍待进一步研究证实。

3 研究展望

迄今为止,外泌体在生殖系统疾病中的研究越来越受到重视,外泌体 miRNA 作为细胞间信号传递的重要物质及潜在治疗靶点,对卵巢颗粒细胞、血管形成和抗氧化微环境调节具有重要作用。经过文献综述发现,外泌体 miRNA 的作用主要表现在两个方面:一方面,正常组织中不同来源的外泌体 miRNA 可以直接发挥功能特异的调控作用;另一方面,药物干预能够改变外泌体 miRNA 的数量和特性,从而改变其功能,这也是外泌体作为药物载体的一项重要应用。在未来的研究中,仍需进一步深入探讨靶向外泌体 miRNA 治疗的开发和应用,以期对卵巢早衰治疗提供更安全有效的方法。

参 考 文 献

- [1] Jankowska K. Premature ovarian failure[J]. Prz Menopauzalny, 2017, 16(2): 51-56.
- [2] Molina JR, Barton DL, Loprinzi CL. Chemotherapy-induced ovarian failure: manifestations and management[J]. Drug Saf, 2005, 28(5): 401-416.
- [3] Wahlgren J, Statello L, Skogberg G, et al. Delivery of small interfering RNAs to cells via exosomes[J]. Methods Mol Biol, 2016, 1364: 105-125.
- [4] Yáñez-Mó M, Siljander PR, Andreu Z, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions [J]. J Extracell Vesicles, 2015, 4 (1): 27060-27066.
- [5] Keerthikumar S, Chisanga D, Ariyaratne D, et al. ExoCarta: a web-based compendium of exosomal cargo[J]. J Mol Biol, 2016, 428(4): 688-692.
- [6] Valadi H, Ekström K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells[J]. Nat Cell Biol, 2007, 9(6): 654-659.
- [7] Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R, et al. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials[J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1820(7): 940-948.

- [8] Haraszti RA, Didiot MC, Sapp E, et al. High-resolution proteomic and lipidomic analysis of exosomes and microvesicles from different cell sources[J]. *J Extracell Vesicles*, 2016, 5(1):32570.
- [9] De Toro J, Herschlik L, Waldner C, et al. Emerging roles of exosomes in normal and pathological conditions: new insights for diagnosis and therapeutic applications[J]. *Front Immunol*, 2015, 6:203.
- [10] Lai RC, Yeo RW, Tan KH, et al. Exosomes for drug delivery—a novel application for the mesenchymal stem cell[J]. *Biotechnol Adv*, 2013, 31(5):543-551.
- [11] Lo Cicero A, Stahl PD, Raposo G. Extracellular vesicles shuffling intercellular messages: for good or for bad[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2015, 35:69-77.
- [12] Munagala R, Aqil F, Jeyabalan J, et al. Bovine milk-derived exosomes for drug delivery[J]. *Cancer Lett*, 2016, 371(1):48-61.
- [13] Vashisht M, Rani P, Onteru SK, et al. Curcumin encapsulated in milk exosomes resists human digestion and possesses enhanced intestinal permeability in vitro[J]. *Appl Biochem Biotech*, 2017, 183(3):993-1007.
- [14] Ban JJ, Lee M, Im W, et al. Low pH increases the yield of exosome isolation[J]. *Biochem Bioph Res Co*, 2015, 461(1):76-79.
- [15] Wang Y, Liu J, Ma J, et al. Exosomal circRNAs: biogenesis, effect and application in human diseases[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1):116.
- [16] Ludwig N, Whiteside TL, Reichert TE. Challenges in exosome isolation and analysis in health and disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(19):4684.
- [17] Zhang Y, Chopp M, Liu XS, et al. Exosomes derived from mesenchymal stromal cells promote axonal growth of cortical neurons[J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(4):2659-2673.
- [18] Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication[J]. *J Proteomics*, 2010, 73(10):1907-1920.
- [19] Gilibert-Estelles J, Braza-Boils A, Ramon LA, et al. Role of microRNAs in gynecological pathology[J]. *Curr Med Chem*, 2012, 19(15):2406-2413.
- [20] Salas-Huetos A, James ER, Aston KI, et al. The Expression of miRNAs in human ovaries, oocytes, extracellular vesicles, and early embryos: a systematic review[J]. *Cells*, 2019, 8(12):1564.
- [21] Imbar T, Eisenberg I. Regulatory role of microRNAs in ovarian function[J]. *Fertil Steril*, 2014, 101(6):1524-1530.
- [22] Da Silveira JC, Veeramachaneni DN, Winger QA, et al. Cell-secreted vesicles in equine ovarian follicular fluid contain miRNAs and proteins: a possible new form of cell communication within the ovarian follicle[J]. *Biol Reprod*, 2012, 86(3):71.
- [23] Guo JQ, Gao X, Lin ZJ, et al. BMSCs reduce rat granulosa cell apoptosis induced by cisplatin and perimenopause[J]. *BMC Cell Biol*, 2013, 14(1):18.
- [24] Yang M, Lin L, Sha C, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomal miR-144-5 p improves rat ovarian function after chemotherapy-induced ovarian failure by targeting PTEN[J]. *Lab Invest*, 2020, 100(3):342-352.
- [25] Santonocito M, Vento M, Guglielmino MR, et al. Molecular characterization of exosomes and their microRNA cargo in human follicular fluid: bioinformatic analysis reveals that exosomal microRNAs control pathways involved in follicular maturation[J]. *Fertil Steril*, 2014, 102(6):1751-1761.
- [26] Huang B, Lu J, Ding C, et al. Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells improve ovary function of premature ovarian insufficiency by targeting SMAD[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1):216.
- [27] Sun L, Li D, Song K, et al. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against cisplatin-induced ovarian granulosa cell stress and apoptosis in vitro[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):2552.
- [28] Sang Q, Yao Z, Wang H, et al. Identification of microRNAs in human follicular fluid: characterization of microRNAs that govern steroidogenesis in vitro and are associated with polycystic ovary syndrome in vivo[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013, 98(7):3068-3079.
- [29] Vashisht M, Rani P, Sunita, et al. Curcumin primed exosomes reverses LPS-induced pro-inflammatory gene expression in buffalo granulosa cells[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(2):1488-1500.
- [30] Rizov M, Andreeva P, Dimova I. Molecular regulation and role of angiogenesis in reproduction[J]. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 2017, 56(2):127-132.
- [31] Xie Q, Cheng Z, Chen X, et al. The role of Notch signaling in ovarian angiogenesis[J]. *J Ovarian Res*, 2017, 10(1):13.
- [32] Wang S, Olson EN. AngiomiRs—key regulators of angiogenesis[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2009, 19(3):205-211.
- [33] Gong M, Yu B, Wang J, et al. Mesenchymal stem cells release exosomes that transfer miRNAs to endothelial cells and promote angiogenesis[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(28):45200-45212.
- [34] Liang X, Zhang L, Wang S, et al. Exosomes secreted by mesenchymal stem cells promote endothelial cell angiogenesis by transferring miR-125 a[J]. *J Cell Sci*, 2016, 129

- (11):2182-2189.
- [35] Zhang Q, Sun J, Huang Y, et al. Human amniotic epithelial cell-derived exosomes restore ovarian function by transferring microRNAs against apoptosis[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 16:407-418.
- [36] Wang X, Huang W, Liu G, et al. Cardiomyocytes mediate anti-angiogenesis in type 2 diabetic rats through the exosomal transfer of miR-320 into endothelial cells[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2014, 74:139-150.
- [37] Mishra B, Ripperdan R, Ortiz L, et al. Very low doses of heavy oxygen ion radiation induce premature ovarian failure[J]. *Reproduction*, 2017, 154(2):123-133.
- [38] Mishra B, Ortiz L, Luderer U. Charged iron particles, components of space radiation, destroy ovarian follicles [J]. *Hum Reprod*, 2016, 31(8):1816-1826.
- [39] Lim J, Ali S, Liao LS, et al. Antioxidant supplementation partially rescues accelerated ovarian follicle loss, but not oocyte quality, of glutathione deficient mice[J]. *Biol Reprod*, 2020, 102(5):1065-1079.
- [40] Copple IM, Dinkova-Kostova AT, Kensler TW, et al. NRF2 as an Emerging Therapeutic Target[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017:8165458.
- [41] Kahroba H, Davatgaran-Taghipour Y. Exosomal Nrf2: From anti-oxidant and anti-inflammation response to wound healing and tissue regeneration in aged-related diseases[J]. *Biochimie*, 2020, 171-172:103-109.
- [42] Saeed-Zidane M, Linden L, Salilew-Wondim D, et al. Cellular and exosome mediated molecular defense mechanism in bovine granulosa cells exposed to oxidative stress[J]. *PLoS One*, 2017, 12(11):e187569.
- [43] Chen B, Sun Y, Zhang J, et al. Human embryonic stem cell-derived exosomes promote pressure ulcer healing in aged mice by rejuvenating senescent endothelial cells[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1):142.
- [44] Ding C, Qian C, Hou S, et al. Exosomal miRNA-320 a is released from hAMSCs and regulates SIRT4 to prevent reactive oxygen species generation in POI[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 21:37-50.
- [45] Ding C, Zhu L, Shen H, et al. Exosomal miRNA-17-5 p derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells improves ovarian function in premature ovarian insufficiency by regulating SIRT7[J]. *Stem Cells*, 2020, 38(9):1137-1148.

(收稿日期:2021-04-09)