

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.01.001

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2019.01.001>

· 论著 ·

MiR-184通过MAPK信号通路促进多囊卵巢综合征 卵巢颗粒细胞的增殖

陈龙^{1,3}, 王曼², 刘利平³

(汉川市人民医院 1. 内分泌科; 2. 生殖科; 3. 妇产科, 湖北 汉川 431600)

[摘要] 目的: 研究microRNA-184(miR-184)在多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)中的作用, 并初步探讨其潜在的作用机制。方法: 采用qRT-PCR检测24例PCOS卵巢组织标本、20例正常卵巢组织标本及人卵巢颗粒细胞KGN和人正常卵巢上皮细胞IOSE80中miR-184的表达情况。通过细胞转染法抑制KGN细胞中miR-184的表达, MTT法检测细胞增殖能力, 平板克隆实验检测细胞克隆形成能力, Western印迹法检测细胞中p-p38 MAPK和p-ERK1/2蛋白表达水平。以终浓度为20 μmol/L的MAPK信号通路特异性抑制剂SB203580处理下调miR-184的KGN细胞, 按照上述方法检测对细胞增殖的影响。结果: PCOS卵巢组织和KGN细胞中miR-184的表达显著上调。在KGN细胞中转染miR-184抑制剂可显著抑制miR-184的表达。下调miR-184的表达后, KGN细胞增殖和细胞克隆形成能力显著降低, 细胞中p-p38 MAPK和p-ERK1/2蛋白表达水平显著下降, 与对照组相比, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。抑制剂SB203580处理下调miR-184的KGN细胞, 细胞增殖和细胞克隆形成能力显著降低, 与单纯下调miR-184的细胞相比, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论: MiR-184能够促进卵巢颗粒细胞的增殖, 其作用机制与MAPK信号通路的激活有关, 可为PCOS的治疗提供潜在的作用靶点。

[关键词] miR-184; MAPK信号通路; 多囊卵巢综合征; 卵巢颗粒细胞

MiR-184 promotes the proliferation of ovarian granulosa cells in polycystic ovary syndrome by MAPK signaling pathway

CHEN Long¹, WANG Man², LIU Liping³

(1. Department of Endocrinology; 2. Department of Reproductive;
3. Department of Obstetrics and Gynecology, Hanchuan People's Hospital, Hanchuan Hubei 431600, China)

Abstract **Objective:** To investigate the role of microRNA-184 (miR-184) in polycystic ovary syndrome (PCOS) and to explore its potential mechanism. **Methods:** Fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the miR-184 expression in 24 cases of PCOS ovarian tissue specimens, 20 normal ovarian tissue specimens, human ovarian granulosa cells KGN and human normal ovarian epithelial cells IOSE80. The

收稿日期 (Date of reception): 2018-08-17

通信作者 (Corresponding author): 王曼, Email: 373299567@qq.com

基金项目 (Foundation item): 湖北省科学技术厅项目 (EK2017D200002000012)。This work supported by the Project of Hubei Provincial Department of Science and Technology, China (EK2017D200002000012).

expression of miR-184 in KGN cells was inhibited by cell transfection. The proliferation of cells was detected by MTT assay. The ability of cell clone formation was detected by plate cloning assay. The p-p38 MAPK and p-ERK1/2 were detected by Western blot. The KGN cells of down-regulated miR-184 were treated with MAPK signaling pathway inhibitor SB203580 with a final concentration of 20 $\mu\text{mol/L}$, and the effect on cell proliferation was detected by the above method. **Results:** The expression of miR-184 was significantly up-regulated in ovarian tissue and KGN cells of polycystic ovary syndrome. Transfection of miR-184 inhibitor in KGN cells significantly inhibited the expression of miR-184. After down-regulating the expression of miR-184, the proliferation of KGN cells and the ability of cell clone formation were significantly decreased, and the expression levels of p-p38 MAPK and p-ERK1/2 protein in the cells were significantly decreased. Compared with the control group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Inhibitor SB203580 down-regulated miR-184 expression in KGN cells, and the cell proliferation and cell clone formation ability were significantly decreased, compared with the cells directly down-regulated miR-184, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** MiR-184 can promote the proliferation of ovarian granulosa cells, and its mechanism is related to the activation of MAPK signaling pathway, which provides a potential target for the treatment of PCOS.

Keywords miR-184; MAPK signaling pathway; polycystic ovary syndrome; ovarian granulosa cells

多囊卵巢综合征(polycystic ovarian syndrome, PCOS)是一种常见的生育年龄女性内分泌及代谢异常导致的疾病, 该疾病的主要特征是慢性无排卵和高雄性激素血症, 临床表现主要有不孕、多毛症、月经失调等症状^[1]。PCOS是无排卵性不孕常见的原因; 此外, PCOS患者患高血压、2型糖尿病、妊娠期糖尿病、心血管疾病以及子宫内膜癌等疾病的风险增加^[2]。目前对PCOS的确切病因仍不十分明确, 但卵巢颗粒细胞的存活和增殖与PCOS密切相关^[3-4]。MicroRNAs(miRNAs)是一类高度保守的非编码RNA, 其在转录后水平影响多种生物学功能。MiRNA的异常表达与多种疾病有关, 包括癌症、代谢紊乱以及近期研究的PCOS^[5-6]。最近研究^[7-8]在PCOS患者卵巢颗粒细胞中已鉴定出多种miRNA表达异常, 如miR-19b和miR-93的表达显著降低。MiR-184在多种细胞中呈现异常表达, 且能够通过调控靶基因或信号通路促进细胞增殖^[9-10]。MiR-184可通过抑制Numb1蛋白的表达, 激活Notch信号通路, 上调下游相关蛋白Hes1和Hes5的表达, 促进神经干细胞增殖^[11]; 在非小细胞肺癌细胞中, miR-184表达显著升高, miR-184直接靶向C-Myc影响细胞生长^[12]。然而, 关于miR-184是否参与促进卵巢颗粒细胞增殖, 是否在PCOS中发挥作用, 目前尚不清楚。MAPK信号通路在多种生物和细胞中具有重要调控作用, 参与机体生长、发育等多种生物学过程。在卵巢颗粒细胞中MAPK信号通路参与细胞增殖、分化、氧化应激等多种过程^[13]。Kong等^[14]研究阿尔茨海默病动物模型发现: miR-184调控MAPK信号通路参与阿尔茨海默病的发病机制,

提示miR-184与MAPK信号通路之间可能存在一定潜在的关系。因此本研究首先确认了miR-184在PCOS患者组织及卵巢颗粒细胞中的表达情况。通过改变卵巢颗粒细胞中miR-184的内源水平来确定miR-184对细胞增殖及MAPK信号通路的影响, 以阐明miR-184对卵巢颗粒细胞增殖影响的潜在机制。

1 材料与方法

1.1 材料

选取汉川市人民医院确认的PCOS卵巢组织标本24例, 年龄20~42(29.67 \pm 6.22)岁。PCOS患者的诊断主要基于2003年修订的鹿特丹人类生殖与胚胎学会/美国生殖医学学会制定的标准。同期选取正常卵巢组织标本20例, 年龄19~42(28.88 \pm 6.14)岁。研究对象均无其他内分泌系统疾病, 近期末服用激素、成瘾性药物。本研究经汉川市人民医院医学中心伦理委员会批准, 并在参与前获得所有研究对象的知情同意。人卵巢颗粒细胞KGN和人正常卵巢上皮细胞IOSE80购于美国ATCC公司; RPMI-1640培养基、胰蛋白酶、胎牛血清购于美国Gibco公司; miR-184抑制剂及抑制剂对照物购于美国Gene Pharma公司; TRIzol试剂和Lipofectamine 2000购于美国Invitrogen公司; 逆转录试剂盒、SYBR premix Ex Taq试剂盒购于日本TaKaRa公司; MTT检测试剂盒购于江苏碧云天生物技术有限公司; BCA蛋白定量试剂盒、ELC发光检测试剂盒购于大连宝生物工程有限公司; p-p38 MAPK抗体、p-ERK1/2抗体及辣根过氧化物酶标

记的二抗均购于美国Novus Biologicals公司。

1.2 qRT-PCR法检测miR-184表达水平

TRIzol法分别提取PCOS卵巢组织、正常卵巢组织、人卵巢颗粒细胞KGN和人正常卵巢上皮细胞IOSE80的RNA。经Nanodrop检测所提取RNA的浓度和纯度, $OD_{260}/OD_{280}=2.1$, 说明提取的RNA可用于后续实验。以RNA为模板采用反转录试剂盒合成cDNA, 将获得的cDNA浓度调整为 $50\text{ ng}/\mu\text{L}$, 采用SYBR premix Ex Taq试剂盒进行荧光定量PCR扩增。以GAPDH为内参, 以相对定量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析组织和细胞中miR-184相对表达水平。

1.3 细胞培养和转染

人卵巢颗粒细胞KGN用含10%胎牛血清RPMI-1640培养基(含 $100\text{ U}/\text{mL}$ 青霉素和 $0.1\text{ mg}/\text{mL}$ 链霉素), 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $5\%\text{ CO}_2$ 的饱和湿度的培养箱中培养。每隔1 d更换新鲜的培养液, 待细胞融合达到约90%时, 弃去培养瓶中的废液, 将细胞用PBS清洗1遍, 加入胰蛋白酶消化传代, 待细胞传代至第3代, 取对数增殖期的细胞进行后续实验。将KGN细胞以 2×10^5 /孔的密度接种在6孔板中, 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中继续培养, 待细胞贴壁后参照Lipofectamine 2000转染试剂说明书进行转染。转染miR-184抑制剂的细胞记为miR-184抑制剂组, 当miR-184抑制剂导入KGN细胞后能够特异性结合miR-184, 一分子miR-184抑制剂能够结合两分子结合miR-184形成稳定复合物, 阻止miR-184对靶标mRNA的翻译抑制。转染抑制剂对照物的细胞记为NC组, 不做任何处理的细胞记为Control组。

1.4 MTT法检测细胞增殖情况

KGN细胞转染24, 48, 72, 96 h后, 分别采用MTT法检测各组细胞增殖能力。即在转染后不同时间点(24, 48, 72, 96 h)分别收集细胞, 分别加入 $20\text{ }\mu\text{L}$ MTT溶液置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱继续孵育4 h, 弃上清后再分别加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 二甲基亚砜, 于震荡仪上裂解10 min。待沉淀完全溶解后, 使用分光光度计在 490 nm 处测定光密度值(OD值)。以测得的OD值为纵轴, 以时间为横轴, 绘制细胞增殖曲线。

1.5 平板克隆实验检测细胞克隆形成能力

各组KGN细胞以200个/皿接种于60 mm的细胞培养皿(含10 mL培养液)中, 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $5\%\text{ CO}_2$ 的培养箱中孵育, 14 d后肉眼可见细胞克隆的形成。小心吸除培养液, 用PBS洗涤2次, 将各组细胞以4%的多聚甲醛固定15 min, 再用0.1%的结晶

紫染色20 min, 用清水清洗染液后风干, 在荧光显微镜下随机选取5个视野统计形成的细胞克隆数(>50 个克隆数为有效克隆)。细胞克隆形成率=细胞克隆数/接种细胞数 $\times 100\%$ 。

1.6 Western印迹法检测细胞中p-p38 MAPK和p-ERK1/2表达水平

各组KGN细胞按照上述方法处理48 h后, 收集各组细胞。将待测各组细胞中加入蛋白裂解液, 置冰上裂解30 min, 提取细胞中的总蛋白, 采用BCA试剂盒对蛋白进行定量。将蛋白质与上样缓冲液以等体积混合, 置于沸水中煮沸5 min, 使蛋白变性, 分别取 $40\text{ }\mu\text{g}$ 变性蛋白加入到每个泳道孔, 以10%的聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离蛋白。待染料进入到分离胶的底部时结束电泳。将凝胶上的蛋白转移至PVDF膜上, 转膜结束后将膜置于以TBST稀释的牛血清白蛋白中封闭4 h。取出膜, 分别置于含p-p38 MAPK一抗(1:500稀释)、p-ERK1/2(1:800稀释)的平皿中, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。将膜置于含二抗(1:3 000稀释)的平皿中, 室温孵育2 h。以TBS洗涤后, 用ECL显色试剂盒显色, 于暗室中用凝胶成像仪拍照, 采用Image J图像分析系统分析各条带灰度值, 以GAPDH为内参蛋白, 以相对灰度值表示p-p38 MAPK和p-ERK1/2蛋白相对表达水平。

1.7 MAPK信号通路抑制剂对转染后的KGN细胞增殖的影响

以终浓度为 $20\text{ }\mu\text{mol}/\text{L}$ 的MAPK信号通路特异性抑制剂SB203580在转染前1 h处理KGN细胞, 按照上述方法转染miR-184 inhibitor, 记为SB203580+抑制剂组。用MTT实验测定处理48 h后细胞的增殖能力, 步骤同1.4。平板克隆实验测定细胞克隆形成能力, 步骤同1.5。

1.8 统计学处理

采用SPSS 21.0软件进行数据分析, 数据均以均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 多组差异以单因素方差进行比较, 组间差异以SNK-q检验进行比较, 每组数据代表3个生物学重复, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MiR-184在PCOS组织和KGN细胞中呈高表达

在正常卵巢组织(Normol)和PCOS卵巢组织中miR-184表达水平分别为1.00, 4.52 ± 0.51 ; 在人正常卵巢上皮细胞IOSE80和人卵巢颗粒细胞KGN中miR-184表达水平分别为1.00, 5.61 ± 0.60 , 差异均

具有统计学意义($P < 0.05$, 图1)。表明miR-184可能在PCOS中起重要作用。

2.2 转染miR-184抑制剂可抑制KGN细胞中miR-184的表达

在KGN细胞中转染miR-184抑制剂后48 h, 检测细胞中miR-184的表达量, Control组、NC组、

miR-184抑制剂组细胞中miR-184的水平分别为1.00, 0.98 ± 0.11 , 0.35 ± 0.04 。与Control组比, NC组KGN细胞中miR-184的水平无较大变化, 差异无统计学意义($P > 0.05$); 与NC组比, miR-184抑制剂组KGN细胞中miR-184的水平显著降低, 差异具有统计学意义($P < 0.05$, 图2)。说明在KGN细胞中转染miR-184抑制剂可抑制miR-184的表达。

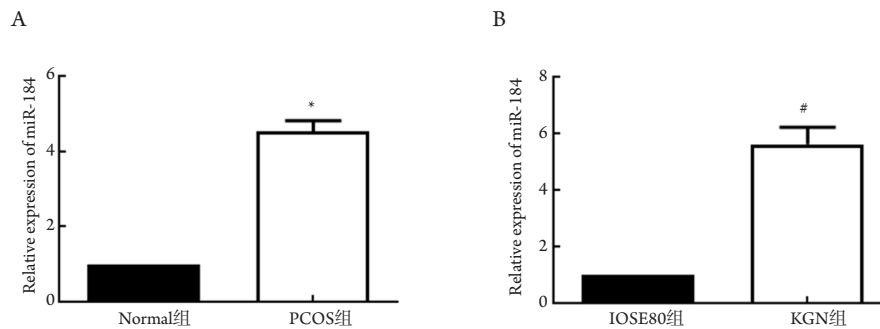


图1 qRT-PCR法检测不同组织和细胞中miR-184的表达水平

Figure 1 qRT-PCR assay for expression of miR-184 in different tissues and cells

(A) miR-184在PCOS卵巢组织和正常卵巢组织中的表达水平; (B) miR-184在人正常卵巢上皮细胞IOSE80和人卵巢颗粒细胞KGN中的表达水平。与Normal组比较, $*P < 0.05$; 与IOSE80组比较, $*P < 0.05$ 。

(A) Expression level of miR-184 in ovarian tissue and normal ovarian tissue of polycystic ovary syndrome; (B) Expression level of miR-184 in human normal ovarian epithelial cells IOSE80 and human ovarian granulosa cells KGN. Compared with the Normal group, $*P < 0.05$; compared with the IOSE80 group, $*P < 0.05$.

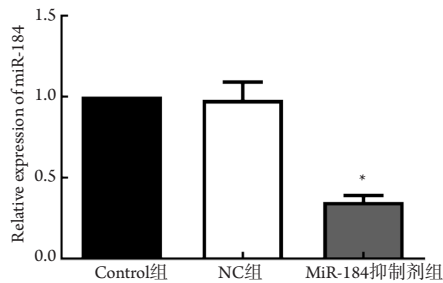


图2 转染miR-184抑制剂对各组KGN细胞中miR-184的表达的影响

Figure 2 Effect of transfection of miR-184 inhibitor on the expression of miR-184 in each group of KGN cells

与NC组比较, $*P < 0.05$ 。

Compared with the NC group, $*P < 0.05$.

2.3 抑制KGN细胞中miR-184的表达可抑制细胞增殖和细胞克隆形成能力

Control组, NC组和miR-184抑制剂组细胞24 h OD值分别为 0.31 ± 0.03 , 0.33 ± 0.04 , 0.21 ± 0.02 ; 48 h OD值分别为 0.55 ± 0.06 , 0.53 ± 0.06 , 0.25 ± 0.04 ; 72 h OD值分别为

0.84 ± 0.08 , 0.86 ± 0.09 , 0.29 ± 0.03 ; 96 h OD值分别为 0.96 ± 0.09 , 0.98 ± 0.11 , 0.34 ± 0.04 。克隆形成率分别为 $(44.13 \pm 3.74)\%$, $(47.58 \pm 4.27)\%$ 和 $(23.86 \pm 3.02)\%$ 。与Control组比, NC组KGN细胞OD值和克隆形成率无变化, 差异无统计学意义($P > 0.05$); 与NC组比, miR-184抑制剂组KGN细胞OD值和克隆形成率显著降低, 差异具有统计学意义($P < 0.05$, 图3)。说明抑制miR-184的表达能够抑制KGN细胞增殖和细胞克隆形成能力。

2.4 下调miR-184抑制KGN细胞中MAPK信号通路的激活

Control组, NC组, miR-184抑制剂组细胞p-p38 MAPK蛋白水平分别为 1.13 ± 0.24 , 1.06 ± 0.18 , 0.31 ± 0.02 ; p38 MAPK蛋白水平分别为 1.21 ± 0.16 , 1.20 ± 0.17 , 1.18 ± 0.20 ; p-ERK1/2蛋白水平分别为 0.65 ± 0.05 , 0.63 ± 0.06 , 0.10 ± 0.01 ; ERK1/2蛋白水平分别为 0.86 ± 0.09 , 0.88 ± 0.08 , 0.83 ± 0.10 。与Control组比, NC组KGN细胞中p-p38 MAPK, p-ERK1/2蛋白表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$); 与NC组比, miR-184抑制剂组KGN细

胞中p-p38 MAPK, p-ERK1/2蛋白表达水平显著降低, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。p38 MAPK和ERK1/2蛋白水平无明显变化($P > 0.05$, 图4)。提示

下调miR-184的表达能够通过抑制KGN细胞中p-p38 MAPK, p-ERK1/2蛋白水平的表达抑制MAPK信号通路的激活。

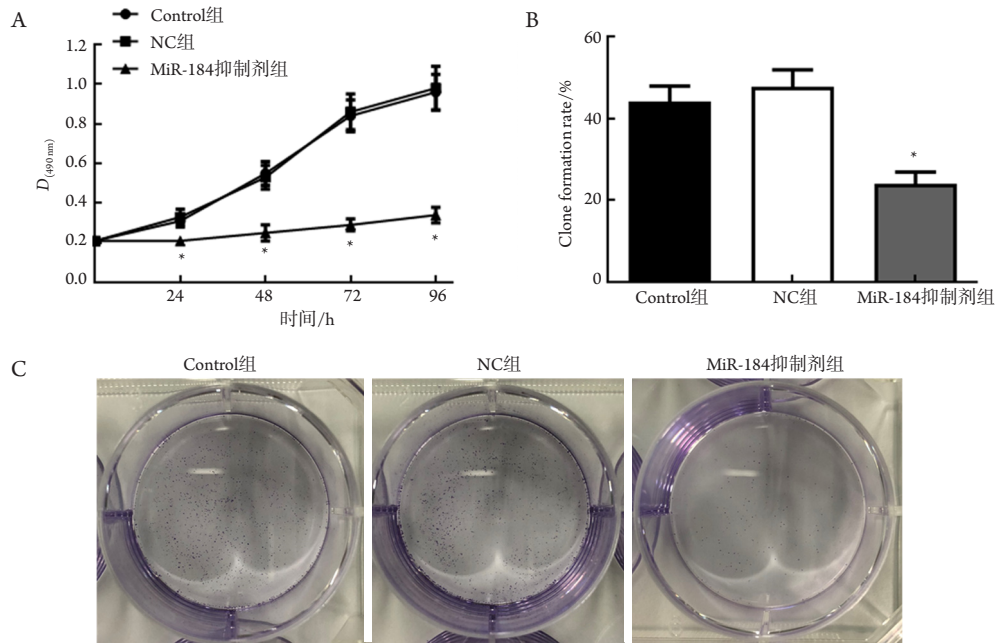


图3 抑制miR-184的表达能够抑制KGN细胞增殖和细胞克隆形成能力

Figure 3 Inhibition of miR-184 expression can inhibit KGN cell proliferation and cell clonality

(A) MTT法检测各组KGN细胞的增殖情况; (B) 各组KGN细胞克隆形成率比较; (C) 克隆形成实验检测各组KGN细胞克隆形成率。与NC组比较, $*P < 0.05$ 。

(A) MTT assay was used to detect the proliferation of KGN cells in each group; (B) Comparison of clone formation rates of KGN cells in each group; (C) Clone formation assay was used to detect the clone formation rate of each group of KGN cells. Compared with the NC group, $*P < 0.05$ 。

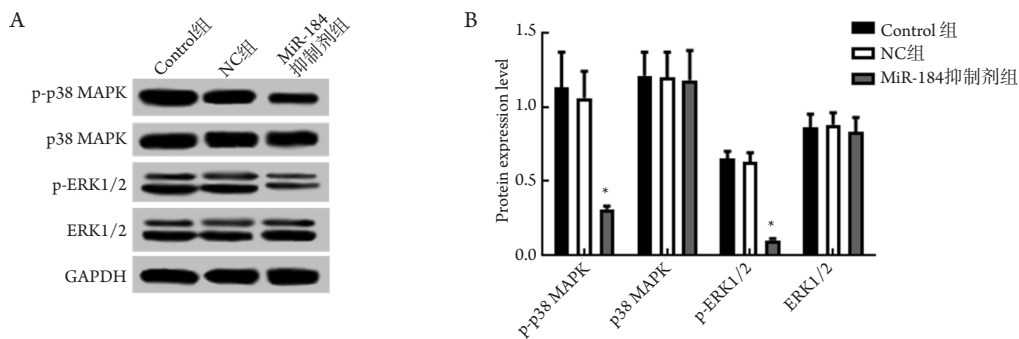


图4 Western印迹法检测各组KGN细胞中p-p38 MAPK, p-ERK1/2蛋白水平

Figure 4 Western blot analysis of p-p38 MAPK and p-ERK1/2 protein levels in each group of KGN cells

(A) Western印迹法检测各组KGN细胞中p-p38 MAPK, p-ERK1/2蛋白水平; (B) 各组KGN细胞中p-p38 MAPK, p-ERK1/2蛋白水平比较。与NC组比, $*P < 0.05$ 。

(A) Western blot analysis of p-p38 MAPK and p-ERK1/2 protein levels in KGN cells; (B) Comparison of p-p38 MAPK and p-ERK1/2 protein levels in KGN cells. Compared with the NC group, $*P < 0.05$ 。

2.5 MAPK信号通路抑制剂对下调miR-184的KGN细胞增殖的影响

miR-184抑制剂组细胞和SB203580+抑制剂组细胞OD值分别为 0.31 ± 0.03 , 0.22 ± 0.01 , 克隆形成率分别为 24.27 ± 2.21 , 15.39 ± 1.44 。与miR-184抑制剂组比, SB203580+抑制剂组细胞OD值

和细胞克隆形成率明显降低, 差异具有统计学意义($P < 0.05$, 图5)。说明MAPK信号通路抑制剂能够增强下调miR-184对KGN细胞增殖和细胞克隆形成能力的抑制作用, 提示miR-184可通过调控MAPK信号通路的激活影响KGN细胞的增殖能力。

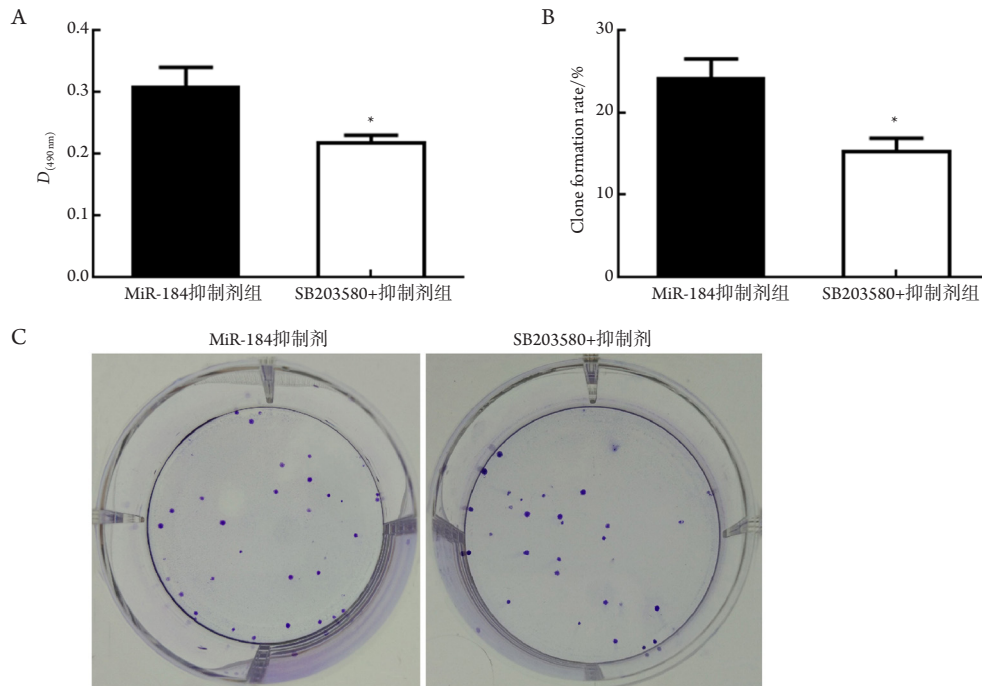


图5 MAPK信号通路抑制剂对各组KGN细胞增殖和克隆形成能力的影响

Figure 5 Effect of MAPK signaling pathway inhibitor on OD value and colony forming ability of KGN cells in each group

(A) MTT法检测各组KGN细胞增殖; (B) 各组KGN细胞克隆形成率比较; (C) 克隆形成实验检测各组KGN细胞克隆形成数。与miR-184抑制剂组比较, $*P < 0.05$ 。

(A) MTT assay was used to detect the proliferation of KGN cells in each group; (B) Comparison of formation rate of KGN cells in each group; (C) Colone formation assay was used to detect the number of clones of KGN cells in each group. Compared with the miR-184 inhibitor group, $*P < 0.05$.

3 讨论

目前研究已证实miRNA参与调控机体生理病理等多种生物学过程, 调控如细胞增殖、凋亡、器官发生、造血、发育及肿瘤发生等。MiR-184在多种疾病中的作用已有报道, 能够调节细胞增殖、分化、迁移、侵袭、凋亡和代谢等过程, 引起专家学者的广泛关注^[15]。在结直肠癌组织和细胞系中miR-184呈低表达, 且miR-184通过可靶向IGF-1R抑制人结直肠癌细胞增殖和转移^[16]。在肾细胞癌中的研究^[17]显示: miR-184抑制PKM2 mRNA和蛋白质的表达导致葡萄糖消耗及乳酸产生

过程明显受到抑制, 细胞增殖亦受到明显抑制。Park等^[18]研究指出: miR-184通过调节Akt和VEGF信号转导途径表现出血管生成抑制特性。Walter等^[19]前列腺癌的研究显示: miR-184在较高等级前列腺癌的癌细胞中高表达, 且与较低等级的前列腺癌相比具有高侵袭性。MiR-184在动物界中高度保守, 已被证明miR-184在调节黑腹果蝇的早期发育过程中具有至关重要的作用, 特别是在雌性种系发育以及卵子发生中^[20]。MiR-184在牛动情周期的黄体期的卵泡中正常增殖颗粒细胞中表达。在卵泡发育过程中, miR-184调节类固醇生成和卵泡成熟, 这是正常颗粒细胞的两个重要生物学功

能^[21]。MiR-184在成人卵巢颗粒细胞瘤中高表达,目前认为高丰度表达miR-184可作为成人卵巢颗粒细胞瘤的特征性分子标志物^[22]。本实验检测PCOS患者卵巢组织、正常卵巢组织中、人卵巢颗粒细胞KGN、人正常卵巢上皮细胞IOSE80中miR-184的表达量,结果显示:miR-184在PCOS患者卵巢组织和人卵巢颗粒细胞KGN中的表达显著升高,此外,通过转染抑制KGN细胞中miR-184的表达,细胞增殖能力显著降低。以上实验结果提示:miR-184可能通过促进卵巢颗粒细胞的增殖参与PCOS的发病过程。

MAPK信号通路是生物体内非常重要的信号转导通路之一,介导生物体生长、发育、分化等生理及病理过程。MAPK是一类广泛存在于哺乳动物体内丝/苏氨酸蛋白激酶,受细菌复合物、物理应激、炎性细胞因子、生长因子等信号或刺激所激活。MAPK家族的信号通路主要由四条途径组成,包括p38 MAPK、蛋白激酶(ERK)、c-Jun N端激酶(JNK)/应激激活的蛋白激酶和ERK5/BMK1。其中p38 MAPK和ERK作为研究最多也最透彻的信号转导途径,影响细胞生长、分化、增殖、凋亡等一系列生物过程^[23]。在卵巢颗粒细胞中MAPK信号通路介导细胞增殖、分化、迁移、凋亡^[24]。胃饥饿素可以通过MAPK, p-ERK和p-Akt等途径调控卵巢颗粒细胞的增殖、凋亡和生殖激素分泌^[25]。研究镉对小鼠卵巢颗粒细胞中pre-mRNA选择性剪切的影响发现:经芯片检测及生物信息学软件的预测发现差异表达miRNA可靶向MAPK信号通路、Ras信号通路等参与细胞增殖抑制、应激反应、凋亡调控、炎症反应等毒性反应^[26]。本研究中,在卵巢颗粒细胞KGN中下调miR-184的表达后发现:p-p38 MAPK, p-ERK1/2蛋白表达水平明显降低,提示miR-184能够调控MAPK信号通路的激活。为进一步研究miR-184通过调控MAPK信号通路影响卵巢颗粒细胞的增殖,本实验在下调miR-184的KGN细胞中添加MAPK信号通路特异性抑制剂,阻断MAPK信号通路,结果显示:MAPK信号通路抑制剂能够进一步抑制KGN细胞增殖能力。以上实验结果提示,miR-184通过调控MAPK信号通路抑制卵巢颗粒细胞的增殖。

综上,抑制miR-184的表达能够抑制卵巢颗粒细胞的增殖,其作用机制与抑制MAPK信号通路有关。MiR-184在PCOS患者卵巢组织和卵巢颗粒细胞中表达量升高,可能与miR-184促进卵巢颗粒细胞增殖有关,可为治疗PCOS提供潜在的靶点。

参考文献

1. 张春梅, 赵越, 乔杰. 多囊卵巢综合征合并代谢综合征临床特点及治疗进展[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2016, 32(9): 915-918.
ZHANG Chunmei, ZHAO Yue, QIAO Jie. Clinical characteristics and treatment progress of polycystic ovary syndrome with metabolic syndrome[J]. Chinese Journal of Practical Gynecology and Obstetrics, 2016, 32(9): 915-918.
2. Yao K, Bian C, Xia Z. Association of polycystic ovary syndrome with metabolic syndrome and gestational diabetes: Aggravated complication of pregnancy[J]. Exp Ther Med, 2017, 14(2): 1271-1276.
3. Das M, Djahanbakhch O, Hachihanefioglu B, et al. Granulosa cell survival and proliferation are altered in polycystic ovary syndrome[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2008, 93(3): 881-887.
4. Xu J, Xiao B, Peng Z, et al. Comprehensive analysis of genome-wide DNA methylation across human polycystic ovary syndrome ovary granulosa cell[J]. Oncotarget, 2016, 7(19): 27899-27909.
5. Roth LW, McCallie B, Alvero R, et al. Altered microRNA and gene expression in the follicular fluid of women with polycystic ovary syndrome[J]. J Assist Reprod Genet, 2014, 31(3): 355-362.
6. 许伟伟, 许昌, 吕映频, 等. 多囊卵巢综合征病人不同部位miRNA表达的研究进展[J]. 青岛大学医学院学报, 2017, 36(3): 369-371.
XU Weiwei, XU Chang, LÜ Yingpin, et al. Research progress of miRNA expression in different parts of patients with polycystic ovary syndrome[J]. Journal of Qingdao University Medical College, 2017, 36(3): 369-371.
7. Xie S, Batnasan E, Zhang Q, et al. MicroRNA Expression is Altered in Granulosa Cells of Ovarian Hyperresponders[J]. Reprod Sci, 2016, 23(8): 1001-1010.
8. Zhong Z, Li F, Li Y, et al. Inhibition of microRNA-19b promotes ovarian granulosa cell proliferation by targeting IGF-1 in polycystic ovary syndrome[J]. Mol Med Rep, 2018, 17(4): 4889-4898.
9. Li W, Wang P, Zhang Z, et al. MiR-184 regulates proliferation in nucleus pulposus cells by targeting GAS1[J]. World Neurosurg, 2017, 97(24): 710-715.
10. Fang Z, Zhao J, Xie W, et al. LncRNA UCA1 promotes proliferation and cisplatin resistance of oral squamous cell carcinoma by suppressing miR-184 expression[J]. Cancer Med, 2017, 6(12): 2897-2908.
11. 黄佛宝, 张昊驹, 刘钰罡, 等. miR-184对小鼠神经干细胞增殖的影响及其机制[J]. 中华神经医学杂志, 2017, 16(3): 262-268.
HUANG Fobao, ZHANG Haoju, LIU Yugang, et al. Effect of miR-184 on proliferation of neural stem cells and its underlying mechanism[J]. Chinese Journal of Neuromedicine, 2017, 16(3): 262-268.
12. Liu Z, Mai C, Yang H, et al. Candidate tumour suppressor CCDC19

- regulates miR-184 direct targeting of C-Myc thereby suppressing cell growth in non-small cell lung cancers[J]. *J Cell Mol Med*, 2014, 18(8): 1667-1679.
13. 陈建勇, 王聪, 王娟, 等. MAPK信号通路研究进展[J]. *中国医药科学*, 2011, 1(8): 32-34.
CHEN Jianyong, WANG Cong, WANG Juan, et al. Research progress of MAPK signaling pathway[J]. *Journal of Medical Sciences*, 2011, 1(8): 32-34.
 14. Kong Y, Jianban WU, Yuan L. MicroRNA expression analysis of adult-onset drosophila Alzheimer's disease model[J]. *Curr Alzheimer Res*, 2014, 11(9): 882-91.
 15. Emdad L, Janjic A, Alzubi MA, et al. Suppression of miR-184 in malignant gliomas upregulates SND1 and promotes tumor aggressiveness[J]. *Neuro Oncol*, 2015, 17(3): 419-429.
 16. Wu G, Liu J, Wu Z, et al. MicroRNA-184 inhibits cell proliferation and metastasis in human colorectal cancer by directly targeting IGF-1R[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(3): 3215-3222.
 17. Huang J, Kong W, Zhang J, et al. c-Myc modulates glucose metabolism via regulation of miR-184/PKM2 pathway in clear-cell renal cell carcinoma[J]. *Int J Oncol*, 2016, 49(4): 1569-1575.
 18. Park JK, Peng H, Yang W, et al. miR-184 exhibits angiostatic properties via regulation of Akt and VEGF signaling pathways[J]. *Faseb J*, 2017, 31(1): 256-265.
 19. Walter BA, Valera VA, Pinto PA, et al. Comprehensive microRNA profiling of prostate cancer[J]. *J Cancer*, 2013, 4(5): 350-357.
 20. Iovino N, Pane A, Gaul U. miR-184 has multiple roles in drosophila female germline development[J]. *Dev Cell*, 2009, 17(1): 123-133.
 21. Salilew-Wondim D, Ahmad I, Gebremedhn S, et al. The expression pattern of microRNAs in granulosa cells of subordinate and dominant follicles during the early luteal phase of the bovine estrous cycle[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e106795.
 22. Cheng WT, Rosario R, Muthukaruppan A, et al. MicroRNA profiling of ovarian granulosa cell tumours reveals novel diagnostic and prognostic markers[J]. *Clin Epigenetics*, 2017, 9(1): 72-80.
 23. Sun Y, Liu W Z, Liu T, et al. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis[J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2015, 35(6): 600-604.
 24. Chen MJ, Chou CH, Shun CT, et al. Iron suppresses ovarian granulosa cell proliferation and arrests cell cycle through regulating p38 MAPK/p53/p21 pathway[J]. *Biol Reprod*, 2017, 106(3): e249.
 25. 马原. GHRL和LPS对小鼠卵巢颗粒细胞的增殖和凋亡及激素分泌的调控作用[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016.
MA Yuan. Regulation of GHRL and LPS on proliferation, apoptosis and hormone secretion of mouse ovarian granulosa cells[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2016.
 26. Wang W, Chen J, Luo L, et al. Effect of cadmium on kitl pre-mRNA alternative splicing in murine ovarian granulosa cells and its associated regulation by miRNAs[J]. *J Appl Toxicol*, 2017, 38(2): 227-239.

本文引用: 陈龙, 王曼, 刘利平. MiR-184通过MAPK信号通路促进多囊卵巢综合征卵巢颗粒细胞的增殖[J]. *临床与病理杂志*, 2019, 39(1): 1-8. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.01.001

Cite this article as: CHEN Long, WANG Man, LIU Liping. MiR-184 promotes the proliferation of ovarian granulosa cells in polycystic ovary syndrome by MAPK signaling pathway[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2019, 39(1): 1-8. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.01.001