

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2025.06.006

陈圆, 侯晗琦, 任宣, 等. 调控 miR-99a 表达对猪颗粒细胞增殖和凋亡的影响 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2025, 47(6): 57-67.

调控 miR-99a 表达对猪颗粒细胞增殖和凋亡的影响

陈圆, 侯晗琦, 任宣, 薛青松, 徐泰然, 李湘萍

广西大学 动物繁殖研究所/亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 南宁 530004

摘要: miR-99a 是一种在卵巢组织中表达较高的 miRNA, 与颗粒细胞在卵泡闭锁过程中的凋亡有关。为了解 miR-99a 对猪颗粒细胞增殖和凋亡的作用, 首先检测了 miR-99a 在不同程度闭锁的猪卵泡中的表达水平, 随后通过正负调控 miR-99a 表达的方法探究其对猪颗粒细胞增殖和凋亡的影响。结果显示, 与健康卵泡(HF)组相比, miR-99a 的表达在早期闭锁卵泡(EF)组中显著升高($p < 0.01$), 在晚期闭锁卵泡(PF)组无显著变化($p > 0.05$)。相较于对照组, miR-99a 过表达组的细胞增殖水平下降, 细胞凋亡水平上升, 细胞周期在 S 期停滞, 细胞周期相关基因 *CDK1* 与 *CDK4* 及促凋亡基因 *BAD* 的表达显著增加($p > 0.05$)。自噬相关基因 *ATG13* 的表达也显著上调($p < 0.05$), 但凋亡相关基因 *BCL-2* 与 *TP53* 的表达变化差异并不显著($p > 0.05$)。与对照组相比, 抑制 miR-99a 表达对细胞周期和凋亡无显著影响, *CDK1*、*CDK4*、*BAD*、*ATG13*、*BCL-2*、*TP53* 的表达无显著变化($p > 0.05$)。以上结果表明, miR-99a 能够有效抑制猪颗粒细胞的增殖并促进其凋亡。

关键词: miR-99a; 颗粒细胞; 闭锁卵泡; 增殖; 凋亡

中图分类号: S828.9⁺1

文献标识码: A

文章编号: 1673-9868(2025)06-0057-11

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Effect of Regulation of miR-99a Expression on Proliferation and Apoptosis of Porcine Granulosa Cells

CHEN Yuan, HOU Hanqi, REN Xuan,
XUE Qingsong, XU Tairan, LI Xiangping

Institute of Animal Reproduction, Guangxi University/State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agricultural Biological Resources, Nanning 530004, China

Abstract: miR-99a is a miRNA with high expression in ovarian tissue, which is associated with apoptosis of

收稿日期: 2025-03-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(32460833); 广西自然科学基金项目(2020GXNSFDA297009)。

作者简介: 陈圆, 硕士研究生, 主要从事动物繁殖与遗传育种研究。

granulosa cells during atresia. In order to investigate the role of miR-99a on proliferation and apoptosis of pig granulosa cells, the present study firstly examined the expression level of miR-99a in pigs with different degrees of atresia, subsequently, its effect on proliferation and apoptosis of porcine granulosa cells was investigated by positive and negative regulation of miR-99a expression. The results showed that the expression of miR-99a in early atretic follicles (EF) was significantly higher than that in healthy follicles (HF) ($p < 0.01$), but not in late atretic follicles (PF) ($p > 0.05$). Compared to the control group, the miR-99a overexpression group showed decreased levels of cell proliferation, the levels of apoptosis were increased and the cell cycle was arrested in S phase, the expression of cell cycle related genes *CDK1*, *CDK4* and *BAD* were significantly up-regulated ($p < 0.01$). The expression of autophagy-related gene *ATG13* was significantly increased ($p < 0.05$). However, the changes in the expression of apoptosis-related genes *BCL-2* and *TP53* were not significant ($p > 0.05$). Compared with the control group, the suppression of miR-99a expression had no significant effect on cell cycle and apoptosis, and the expression of *CDK1*, *CDK4*, *BAD*, *ATG13*, *BCL-2* and *TP53* had no significant change ($p > 0.05$). These results suggest that miR-99a can effectively inhibit the proliferation and promote the apoptosis of pig granulosa cells.

Key words: miR-99a; granulosa cells; follicular atresia; proliferation; apoptosis

卵泡成熟需历经募集、选择及优势化 3 个关键阶段, 整个过程非常复杂。由于氧化应激、激素、细胞因子和线粒体损伤等因素影响, 排卵前的卵泡会停止发育并且渐渐退化, 最终消失, 这个过程被称为卵泡闭锁^[1]。在卵泡发育过程中, 高达 99.9% 的卵泡会发生闭锁, 不到 0.01% 的卵泡发育成熟并排卵^[2]。卵泡闭锁会发生在卵泡发育的任意阶段, 且大多数在有腔卵泡阶段发生闭锁^[3]。闭锁卵泡中的颗粒细胞比母细胞和卵泡膜细胞更提前启动凋亡程序^[4]。因此, 颗粒细胞凋亡通常被视为卵泡闭锁的潜在机制。

颗粒细胞参与了卵泡发育和卵母细胞减数分裂阻滞, 而颗粒细胞与卵母细胞之间主要通过间隙连接进行交流, 小分子物质如细胞代谢产物、离子和 mRNA 等可以从颗粒细胞进到卵母细胞, 这些小分子物质对于卵母细胞减数分裂、能量产生和酸碱平衡都很关键^[5-6]。颗粒细胞凋亡时, 会出现细胞皱缩、DNA 断裂以及相关基因表达的异常等现象。Sun 等^[7]研究发现, miRNA 在颗粒细胞凋亡进程中扮演着关键角色。miR-23a 通过下调颗粒细胞中 *BCL-2* 的表达水平, 激活 ERK1/2 信号通路, 促进颗粒细胞发生凋亡^[8]。姚勇^[9]研究发现 miR-1275 通过靶向 LRH-1 的 3'UTR 区域, 降低 LRH-1 的表达, 间接阻止了 LRH-1 蛋白与 *CYP19A1* 基因启动子进行相互作用, 抑制雌二醇的合成, 以促进猪颗粒细胞凋亡^[10]。

在不同闭锁阶段的猪和牛卵泡中, miR-99a 的表达水平存在差异。林飞^[11]通过分析猪早期闭锁卵泡 miRNA 的表达情况, 筛选出了 23 条差异表达的 miRNA, 其中有 12 个 miRNA 表达上调, 包括 miR-26b、miR-10b、miR-99a 等, 11 个 miRNA 表达下调。其中, 随着猪卵泡闭锁程度的加深, miR-99a 和 miR-10b 的表达水平也在增加。李润^[12]指出, miR-99a 和 miR-10b 的表达水平随水牛卵泡闭锁程度的增加而下调。然而, miR-99a 在卵泡闭锁过程中的作用及机制尚不清楚。为了探究 miR-99a 在猪颗粒细胞的增殖与凋亡过程中的作用, 本研究首先分析 miR-99a 在不同闭锁程度猪卵泡中的表达情况, 随后通过调节 miR-99a 的表达水平, 研究其对猪颗粒细胞增殖和凋亡的影响。该结果可作为 miR-99a 在卵泡闭锁过程中调控机制的参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 组织、细胞和菌株

猪卵巢样本取自南宁市鲁班路所在屠宰场, 猪卵巢颗粒细胞(Porcine Granular Cells)和 293T 细胞由

本实验室保存。此外, DH5 α 感受态购自 TransGen Biotech 公司, sus-miR-99a mimic、sus-miR-99a inhibitor 均购自锐博生物公司。

1.1.2 载体与质粒

pRL-TK 为亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室保存。

1.1.3 主要试剂

限制性内切酶 XbaI、Tuborfect、SYBR Green qPCR Mix 购自 Thermo 公司; 同源重组酶 Exnase、去 gDNA 反转录试剂盒、去 gDNA 特异性反转录引物转录试剂盒、CCK-8 试剂盒购自南京诺唯赞生物公司; DNA Marker 购自北京天根生化公司; dNTPs 原料、超螺旋 DNA ladder Marker、T4 连接酶购自 TaKaRa 公司; Trizol、Trizol LS 购自 Invitrogen 公司; 普通琼脂糖凝胶回收试剂盒、普通质粒提取试剂盒、2 $\times$ Taq PCR Master Mix 试剂购自索莱宝公司; RFect 购自常州百代生物公司; 双荧光素酶试剂盒购自 Promega 公司; PI 购自 Biolab 公司; 凋亡试剂盒购自 BD 公司。细胞培养所用试剂均购自 Sigma。

1.1.4 引物设计与合成

引物的设计采用了 BLAST、Oligo 7 和 Primer 5 软件, 合成工作则委托给上海生工生物公司。所使用的引物信息详见侯晗琦^[12]所用引物。

1.2 方法

1.2.1 不同闭锁程度卵泡的分离

卵巢取自屠宰场, 依次使用 75% 酒精、38.5 $^{\circ}$ C 生理盐水、75% 酒精、PBS 溶液清洗卵巢, 用手术器械剪取卵泡, 放入 PBS 清洗。依据卵泡分类标准^[13-14], 将猪卵泡划分为健康卵泡(HF)、早期闭锁卵泡(EF)以及晚期闭锁卵泡(PF)。卵丘清洗后迅速放置于无菌 EP 管中, 并存放于液氮中。

1.2.2 细胞的分离与培养

猪颗粒细胞的分离培养参考吕嘉顺^[15]的方法。

1.2.3 组织样品总 RNA 的提取和反转录 PCR 反应

采用 Trizol 法提取样品总 RNA, 根据去 gDNA 反转录试剂盒、去 gDNA 特异性反转录引物转录试剂盒说明书(Vazyme 公司)进行普通反转录和特异性反转录。以 cDNA 稀释液作为模板, 加入 PCR 引物和 SYBR Green qPCR Mix(Thermo)进行反应。程序为: 95 $^{\circ}$ C, 5 min; 95 $^{\circ}$ C, 30 s; 60 $^{\circ}$ C, 30 s; 72 $^{\circ}$ C 30 s, 循环 40 次。选取 GAPDH 作为内参基因, 通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 mRNA 相对表达量。

1.2.4 miRNA 的转染

采用脂质体介导的瞬时转染法进行 miRNA 转染。接种细胞, 当细胞汇合度约为 70% 时, 使用 RFect 转染试剂进行 miRNA 转染, 4~24 h 后, 更换细胞培养基, 培养 24~72 h 后, 收集细胞进行检测。

1.2.5 细胞活力检测(CCK-8 法)

在本研究中, 将 5 000 个细胞接种于 96 孔板, 每日更换培养基。在每个孔中加入 10 μ L CCK-8 溶液, 38 $^{\circ}$ C 孵育 1~4 h。随后, 用酶标仪在 450 nm 波长处检测吸光度。从试验开始, 每 24 h 测量一次, 试验设置 3 重复样本, 依据所得数据绘制出曲线。

1.2.6 细胞增殖/毒性检测

采用 CCK-8 法进行检测。接种 5 000~10 000 个细胞至 96 孔板, 于培养箱内孵育过夜, 待细胞汇合度达 50%, 采用脂质体转染法转染 miRNA 至颗粒细胞, 在每个孔中添加 10 μ L CCK-8 溶液, 并在 CO₂ 培养箱中孵育 1~4 h。从处理开始时间 0 h 起, 每隔 12 h 进行一次处理, 直至 72 h 结束。于 450 nm 处测定吸光度, 根据 OD 值进行细胞增殖活力和毒性分析。试验分为处理组孔、空白组孔、对照组孔 3 个组。

1.2.7 细胞周期检测(PI 染色法)

使用胰酶消化法收集细胞,于 75%乙醇溶液中固定 2 h,2 000 rpm 离心 5~10 min,加入 500 μL 的 20 $\mu\text{g/mL}$ RNase 溶液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,加入 500 μL 的 10~50 $\mu\text{g/mL}$ PI 溶液,混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min。在流式细胞仪上于 488 nm 激发波长处检测荧光,利用 MFLYT 软件分析结果。

1.2.8 细胞凋亡检测

采用 FITC/PI 双染法进行检测。在收集细胞后,将其重悬于 300 μL 的 1 $\times$ Binding Buffer 中,然后加入 5 μL 的 Annexin V-FITC,并充分混匀。接着,将混合物在室温下避光孵育 15 min,加入 200 μL 1 $\times$ Binding Buffer 和 5 μL PI,混匀,5 min 后上样检测。结果由 Flowjo 软件进行分析。

1.2.9 统计学方法

各组数据采用 SPSS 软件统计分析,运用单因素方差分析(ANOVA),结果以均值 $\pm$ 标准误呈现。显著性水平用 p 值表示,其中 $p<0.05$ 表示显著差异, $p<0.01$ 表示极显著差异。

2 结果与分析

2.1 miR-99a 在不同闭锁程度猪卵泡中的表达

结果显示,miR-99a 的表达在闭锁程度逐渐增加时呈现出先上升后下降的趋势。与健康卵泡组(HF)相比,miR-99a 在早期闭锁卵泡组(EF)的表达水平显著提高($p<0.05$),而在晚期闭锁卵泡组(PF)中变化不显著($p>0.05$)。相较于 EF 组,PF 组中 miR-99a 的表达量显著下调($p<0.05$)(图 1)。

2.2 miRNA 处理条件的摸索

为了选择合适的试验代数,选取第 0、3、6 代猪颗粒细胞检测细胞增殖速度。结果显示,第 0 和 6 代细胞的生长速度较慢,而第 3 代颗粒细胞的生长曲线呈现典型的“S”形,表明其生长状态良好(图 2)。因此,选择第 3 代细胞用于后续试验。

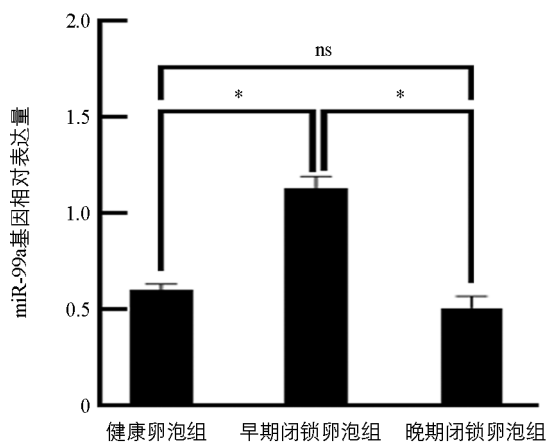


图 1 miR-99a 在各种卵泡中的表达水平

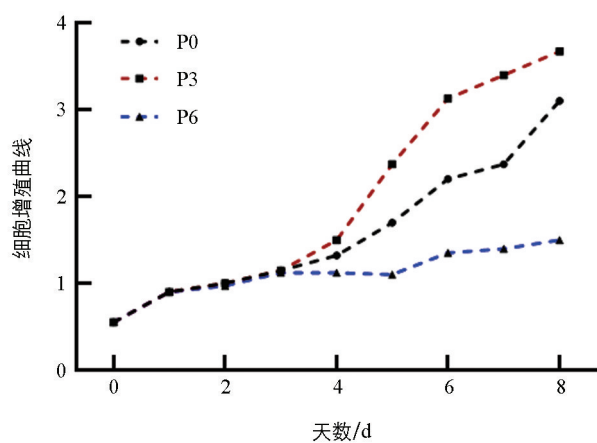


图 2 第 0、3、6 代猪颗粒细胞的生长曲线

为了摸索 Mimics 适宜的转染时间和浓度,分别使用 25 nmol/L、50 nmol/L、100 nmol/L 的 miR-99a Mimics 处理猪颗粒细胞 48 h,并设置空白对照组(MOCK 组)和阴性对照组(Mimics-NC 组)。结果显示,与 MOCK 组相比,25 nmol/L、50 nmol/L 和 100 nmol/L 组的 miR-99a 表达量均有极显著差异($p<0.01$)。与 Mimics-NC 组相比,miR-99a 表达量在 25 nmol/L 组中没有变化($p>0.05$),在 50 nmol/L 和 100 nmol/L 显著升高,miR-99a 表达量在 50 nmol/L 组与 100 nmol/L 组之间没有显著差异($p>0.05$),选择 50 nmol/L 浓度进行后续试验(图 3)。

为了确定 miR-99a 抑制剂的最佳处理条件, 使用了 25 nmol/L、50 nmol/L 和 100 nmol/L 浓度的 miR-99a 抑制剂对猪颗粒细胞处理 48 h, 并设置了对照组: MOCK 组和 Inhibitors-NC 组。结果显示, 与 MOCK 组相比, 25 nmol/L 组的 miR-99a 表达量显著降低($p<0.05$), 而 50 nmol/L 组和 100 nmol/L 组的降低极显著($p<0.01$)。值得注意的是, 50 nmol/L 和 100 nmol/L 抑制剂组之间差异不显著($p>0.05$) (图 4)。由于 miRNA 抑制剂存在竞争性抑制机制及其效率的因素, 此结果为后续试验提供了参考。选择 100 nmol/L 进行后续试验。

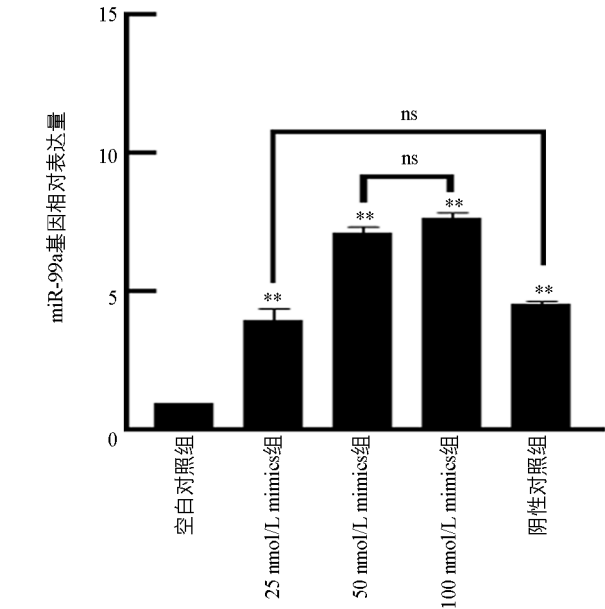


图 3 miR-99a mimics 对颗粒细胞 miR-99a 表达的影响

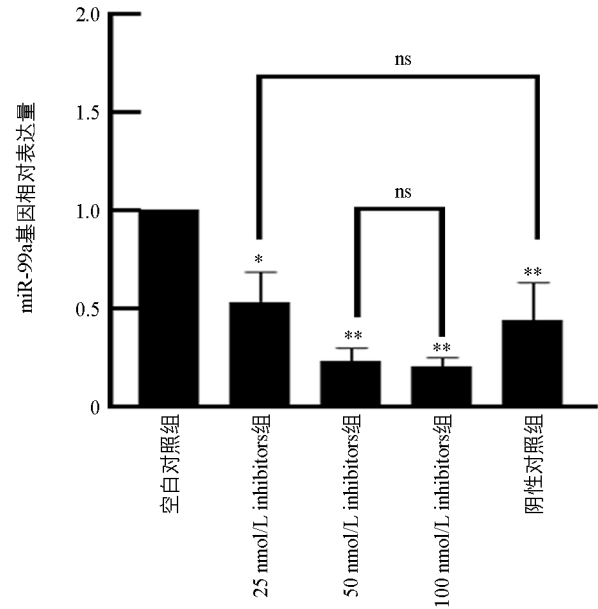


图 4 miR-99a inhibitors 对颗粒细胞 miR-99a 表达的影响

2.3 过表达 miR-99a 抑制猪颗粒细胞增殖

为研究 miR-99a 对猪颗粒细胞增殖的影响, 采用 CCK-8 方法评估细胞增殖速度。试验设置空白对照组、miR-99a 过表达组和阴性对照组, 并另配置一孔仅加入细胞培养液, 用于检测误差。结果表明, 相较于对照组, 过表达组的细胞增殖能力显著下降(图 5)。

2.4 正负调控 miR-99a 表达对猪颗粒细胞周期的影响

使用 PI 染色法检测颗粒细胞周期, 结果显示, 阴性对照组与空白对照组相比, 细胞周期变化不大。与对照组相比, 过表达组的细胞碎片增多, G1 期的细胞含量减少, S 和 G2 期增多, 细胞发生 G2/M 期停滞(图 6)。与空白对照组相比, miR-99a 抑制组、阴性对照组 G1 期细胞的含量减少, S 期增多, G2 期没有变化; 与阴性对照组相比, ImiR-99a 抑制组细胞周期没有变化(图 7)。

2.5 上/下调 miR-99a 表达对猪颗粒细胞凋亡的影响

对细胞凋亡水平进行分析, 结果显示, 与空白对照组相比, 过表达组早期凋亡细胞数量、晚期凋亡数量变化的正常细胞占比小, 减少了 11.6%; 部分坏死细胞、早期凋亡及晚期凋亡细胞占比大, 部分坏死细

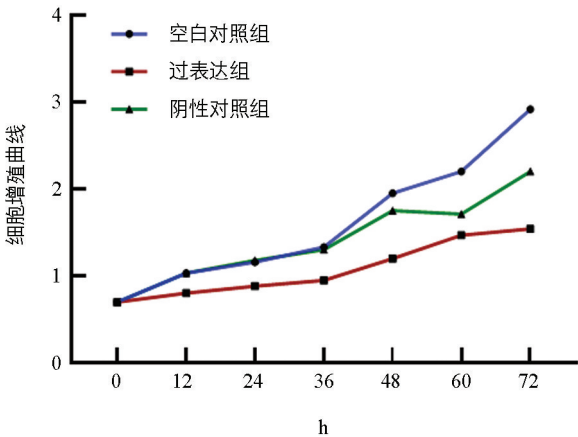


图 5 细胞增殖曲线绘制

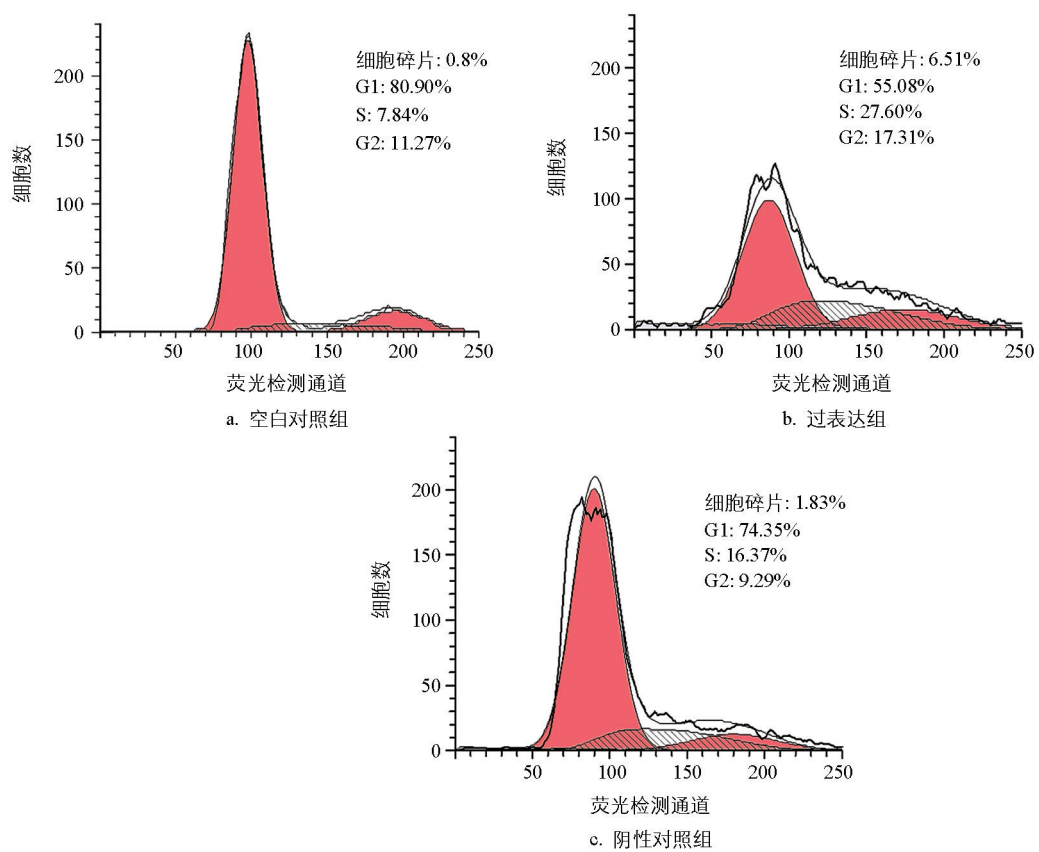


图 6 上调 miR-99a 对细胞周期的影响

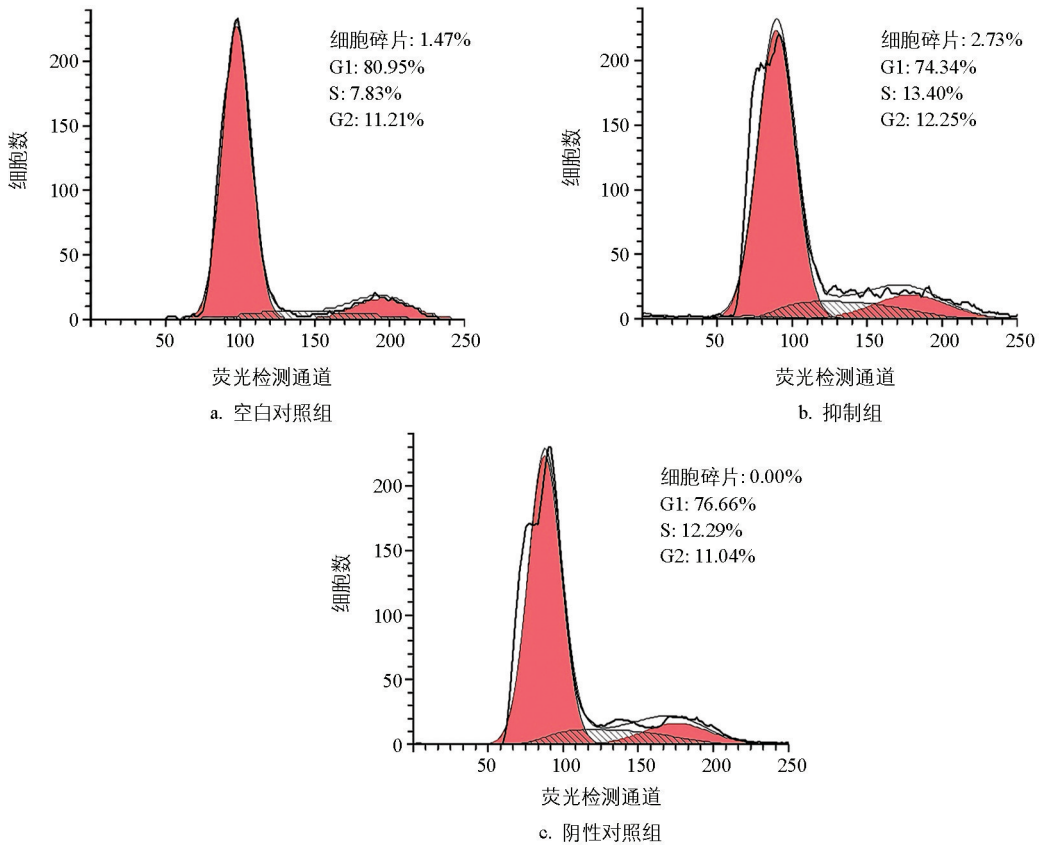


图 7 下调 miR-99a 表达对细胞周期的影响

胞、早期凋亡细胞及晚期凋亡细胞占比增加 11.68%，仅晚期凋亡和部分坏死细胞占比就增加了 10.27%。与阴性对照组相比，过表达组的正常细胞占比减少了 7.1%，部分坏死细胞、早期凋亡及晚期凋亡细胞占比增加了 6.6%，仅部分坏死细胞和晚期凋亡细胞占比就增大了 5.4%(图 8)。分析数据时，把活细胞分为 4 个区，Q1~Q4 分别是正常、早期凋亡、部分坏死及晚期凋亡和坏死细胞区。

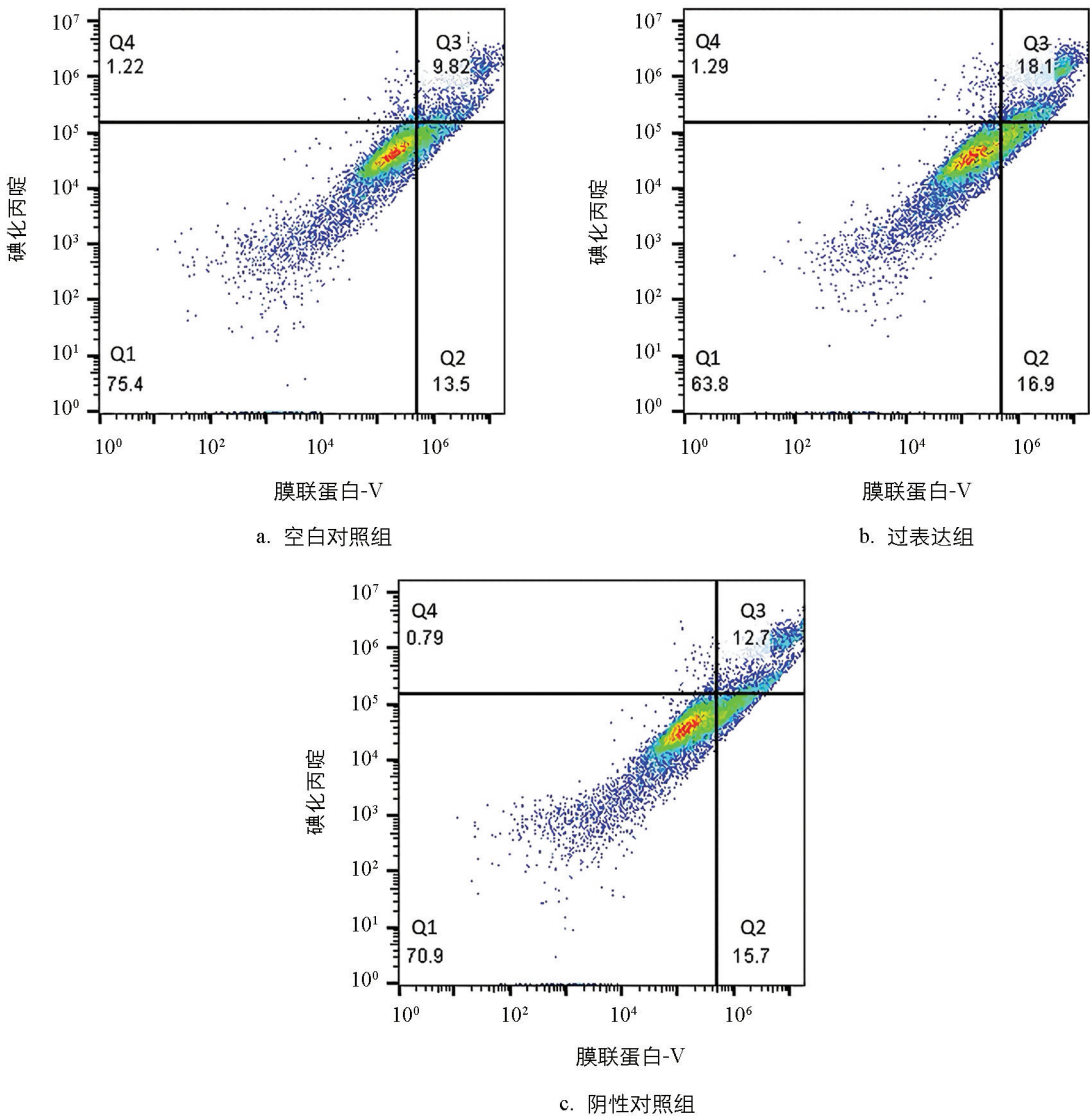


图 8 过表达 miR-99a 对细胞凋亡水平的影响

与对照组相比，抑制组的部分坏死细胞、早期凋亡及晚期凋亡细胞占比几乎不变。经过对 miR-99a 进行过表达处理后，颗粒细胞的凋亡水平显著上升，但抑制 miR-99a 并未对细胞凋亡水平产生明显影响(图 9)。

2.6 正负调控 miR-99a 表达对猪颗粒细胞中基因表达的影响

检测了与凋亡相关的基因 *BCL-2*、*ATG13*、*BAD*，细胞周期依赖性激酶基因 *CDK1*、*CDK4*、*TP53* 的表达情况。与 MOCK 组相比，Mimics 组颗粒细胞中 *CDK1*、*CDK4*、*BAD* 基因表达极显著升高 ($p < 0.01$)，*ATG13* 基因表达显著上调 ($p < 0.05$)，*BCL-2* 与 *TP53* 基因的表达增加 ($p > 0.05$)，图 10)。

与 MOCK 组相比，Inhibitors 组颗粒细胞中 *CDK1*、*ATG13*、*TP53* 基因表达降低 ($p > 0.05$)，*CDK4*、*BCL-2*、*BAD* 基因的表达无显著变化 ($p > 0.05$)，图 11)。

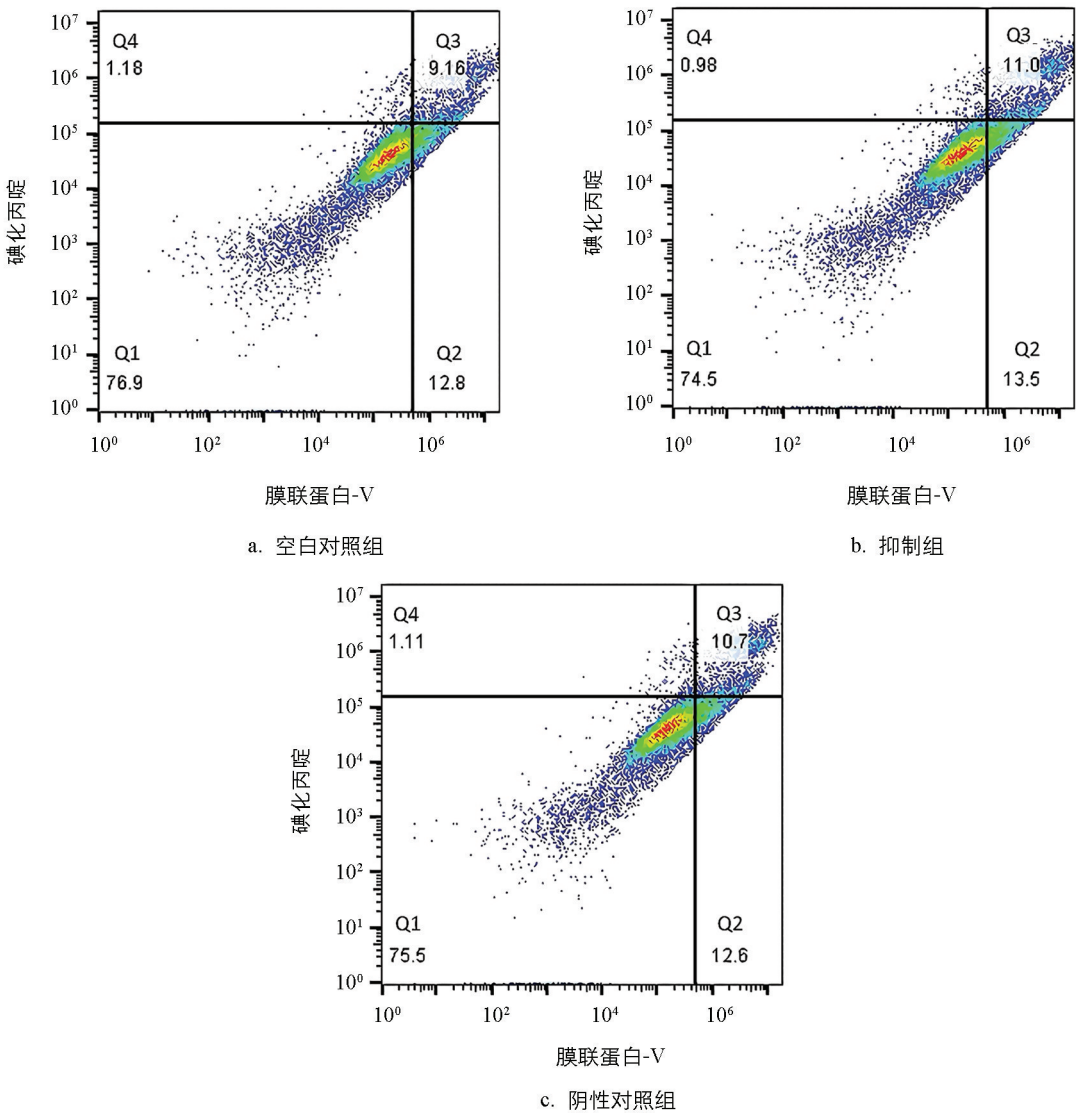


图 9 抑制 miR-99a 对细胞凋亡水平的影响

3 讨论与结论

3.1 讨论

研究表明，不同闭锁程度的卵泡中 miR-99a 的表达水平存在显著差异。具体而言，早期闭锁卵泡的 miR-99a 表达量明显高于健康卵泡和晚期闭锁卵泡。随着卵泡的发育，miR-99a 的表达水平开始上升，随后逐渐降低。早期闭锁卵泡中的 miR-99a 显著表达加速了卵泡闭锁的进程，作为卵泡筛选机制的重要一环，导致大量卵泡被淘汰，难以进一步发育为优势卵泡。闭锁卵泡中 miR-99a 表达水平的上升可能与优势卵泡或卵母细胞中某些特定激素和细胞因子的作用密切关联。Hu 等^[16]指出，卵巢中 Dicer 酶的剪接异构体 Dicer-a 和 Dicer-b 的表达量均随着卵泡直径的增大呈现先升高后降低的趋势，在闭锁卵泡和排卵后卵泡中，Dicer-a 表达量降低，Dicer-b 表达量增加，增加的 Dicer-b 参与细胞凋亡的调控。借助 Dicer 酶的催化作用，早期闭锁卵泡中的 miR-99a 前体被加工为成熟的 miR-99a 序列，与 AGO 等组分结合形成 RISC 复合体，并不断累积。AGO 对 miR-99a 的装载效率以及 Dicer 酶的活性，对该时期 miR-99a 积累及其功能发挥着关键作用。

过表达 miR-99a 后，颗粒细胞的增殖受到抑制，凋亡水平上升，颗粒细胞 G1 期减少，S 期增加，G2 期

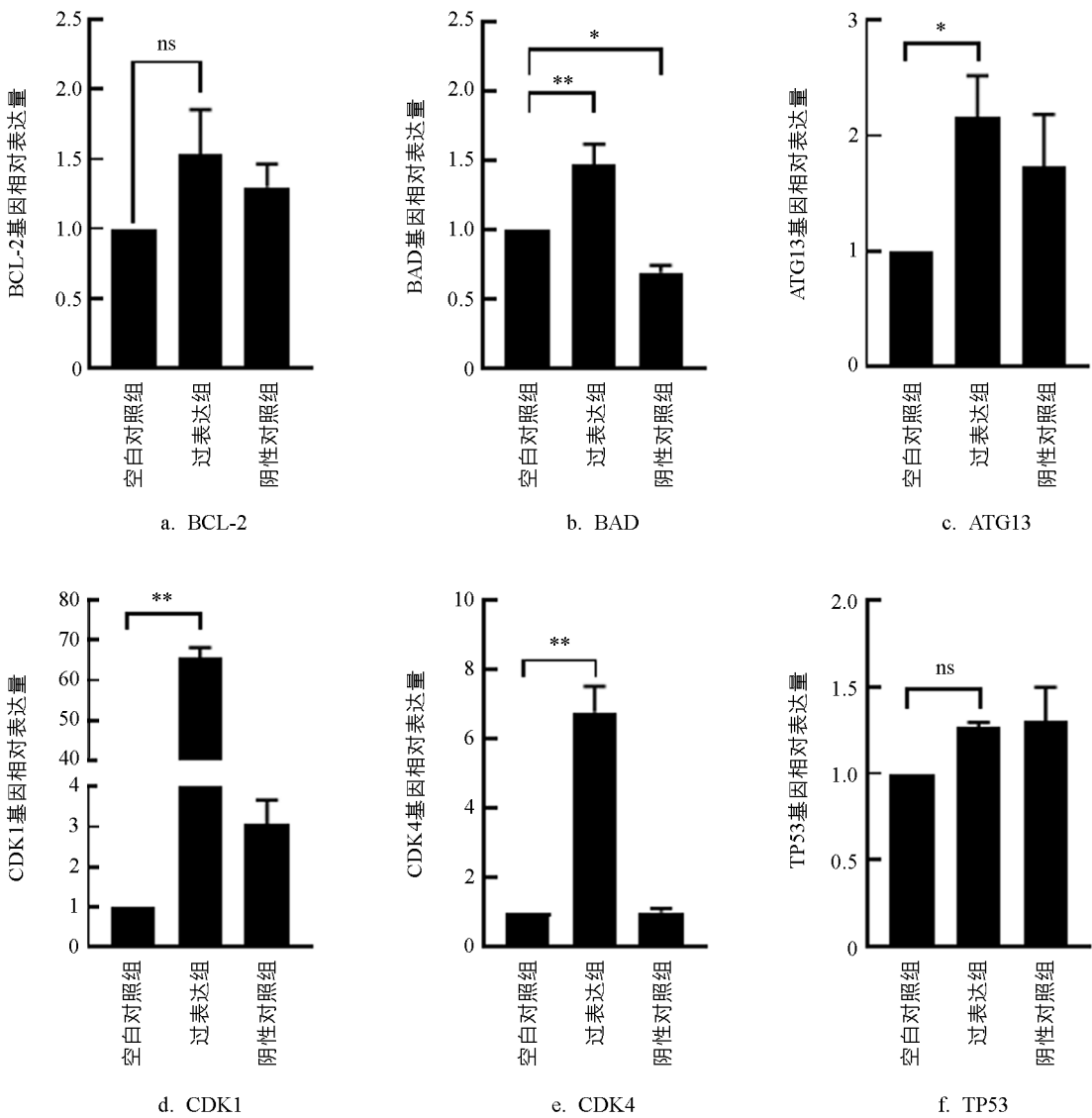


图 10 上调 miR-99a 对相关基因表达的影响

略有增加。Mueller 等^[17]研究发现当 miR-99a 表达下调时,细胞对 DNA 损伤的敏感性增加。miR-99a 可能通过靶向 SMARCA5 基因编码的蛋白 SNF2H,间接诱导细胞周期在 S 期停滞。过表达的 miR-99a 可能对 SNF2H 蛋白产生抑制作用,阻碍其相关染色质重塑复合物介导的 DNA 修复过程,使细胞在 S 期检查点处停滞。若这一假设成立,那么在卵泡中过表达 miR-99a 可能会阻碍受损 DNA 的修复,导致 DNA 受损的颗粒细胞无法继续增殖。

过表达 miR-99a 可以上调促凋亡基因 *BAD* 和细胞周期蛋白依赖性激酶基因 *CDK1*、*CDK4* 的表达,其处于 mTORC2 信号通路下游的 AKT/BAD 通路,该通路可促进细胞凋亡,并且能够被 Torin2 抑制^[18-19]。miR-99a 对颗粒细胞凋亡的影响还可能与线粒体途径有关。miR-99a 还上调自噬相关基因 *ATG13* 的表达量,增加颗粒细胞的自噬水平。通过过表达 miR-99a 促进了颗粒细胞凋亡和抑制了颗粒细胞增殖,为探究 miRNA 在细胞增殖和凋亡中的作用提供了新的参考。

3.2 结论

miR-99a 通过影响颗粒细胞的细胞周期、增殖和凋亡,导致细胞周期在 S 期发生阻滞,抑制细胞增殖,并促进细胞凋亡的相关基因表达变化。

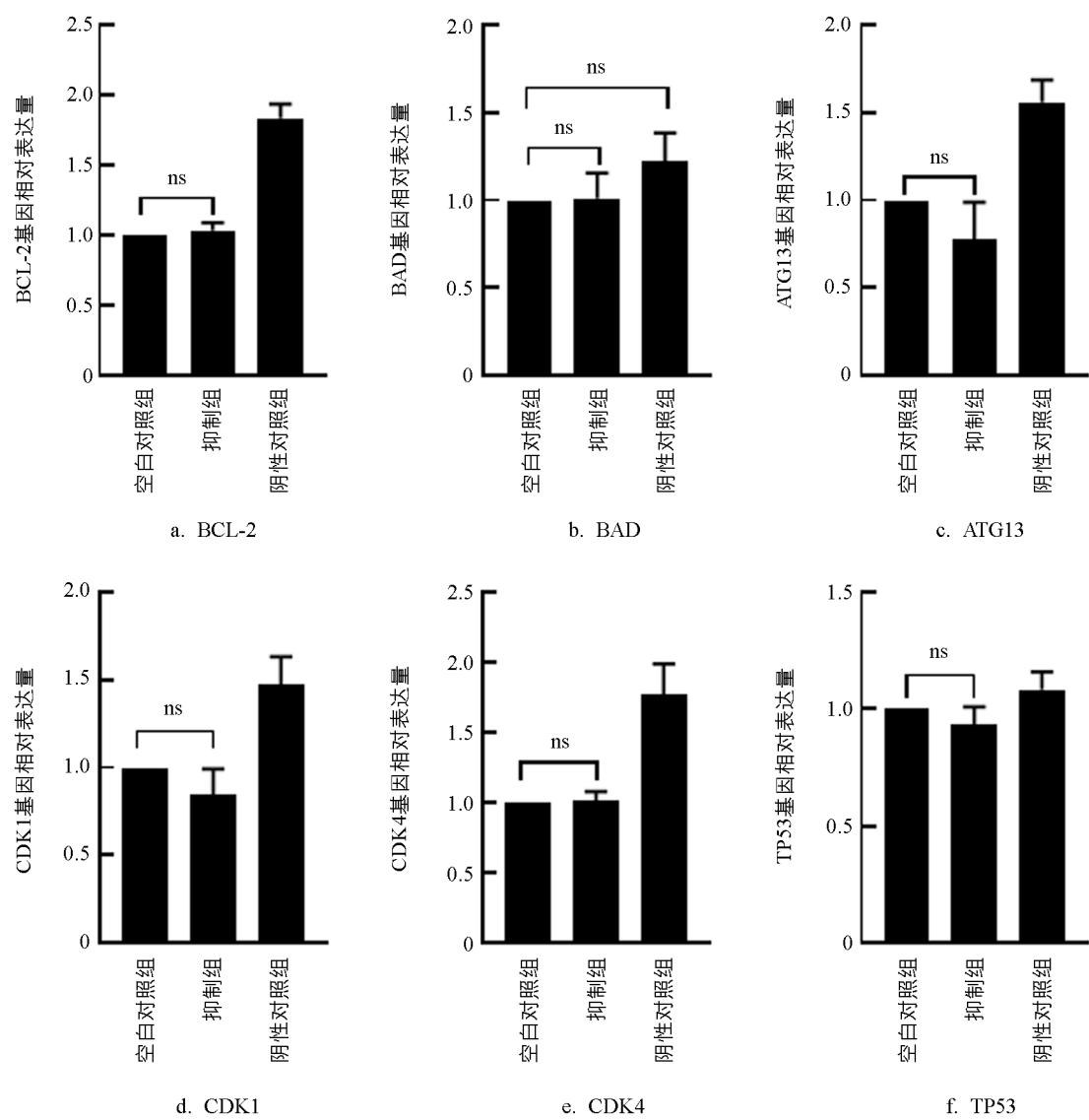


图 11 下调 miR-99a 对相关基因表达的影响

参考文献：

[1] 刘红林, 孟繁星. 氧化应激对动物有腔卵泡闭锁的影响及机制 [J]. 南京农业大学学报, 2019, 42(1): 6-13.

[2] ZHOU J W, PENG X W, MEI S Q. Autophagy in Ovarian Follicular Development and Atresia [J]. International Journal of Biological Sciences, 2019, 15(4): 726-737.

[3] MATSUDA F, INOUE N, MANABE N, et al. Follicular Growth and Atresia in Mammalian Ovaries; Regulation by Survival and Death of Granulosa Cells [J]. Journal of Reproduction and Development, 2012, 58(1): 44-50.

[4] SHAN X, YU T, YAN X, et al. Proteomic Analysis of Healthy and Atretic Porcine Follicular Granulosa Cells [J]. Journal of Proteomics, 2021, 232: 104027.

[5] ANDERSON E, ALBERTINI D F. Gap Junctions between the Oocyte and Companion Follicle Cells in the Mammalian Ovary [J]. The Journal of Cell Biology, 1976, 71(2): 680-686.

[6] RACOWSKY C, SATTERLIE R A. Metabolic, Fluorescent Dye and Electrical Coupling between Hamster Oocytes and Cumulus Cells during Meiotic Maturation in Vivo and in Vitro [J]. Developmental Biology, 1985, 108(1): 191-202.

[7] SUN X Q, SU S, ZHANG G X, et al. miR-204 Suppresses Cell Proliferation and Promotes Apoptosis in Ovarian Granulosa Cells via Targeting TPT1 in Polycystic Ovary Syndrome [J]. Biochimie et Biologie Cellulaire, 2019, 97(5): 1040-1050.

554-562.

[8] LUO H N, HAN Y, LIU J, et al. Identification of microRNAs in Granulosa Cells from Patients with Different Levels of Ovarian Reserve Function and the Potential Regulatory Function of miR-23a in Granulosa Cell Apoptosis [J]. Gene, 2019, 686: 250-260.

[9] 姚勇. miR-1275 靶向 NR5A2 调控猪卵泡雌激素生成和颗粒细胞凋亡 [D]. 南京: 南京农业大学, 2014.

[10] LIU J Y, LI X Y, YAO Y, et al. miR-1275 Controls Granulosa Cell Apoptosis and Estradiol Synthesis by Impairing LRH-1/CYP19A1 Axis [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms, 2018, 1861(3): 246-257.

[11] 林飞. 猪卵泡闭锁的特征与 miRNA 调控研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2011.

[12] 李润. 水牛颗粒细胞凋亡相关基因和 miRNA 表达及雌二醇对其表达调控的研究 [D]. 南宁: 广西大学, 2014.

[13] ALONSO-POZOS I, ROSALES-TORRES A M, ÁVALOS-RODRÍGUEZ A, et al. Mechanism of Granulosa Cell Death during Follicular Atresia Depends on Follicular Size [J]. Theriogenology, 2003, 60(6): 1071-1081.

[14] JOLLY P D, SMITH P R, HEATH D A, et al. Morphological Evidence of Apoptosis and the Prevalence of Apoptotic Versus Mitotic Cells in the Membrana Granulosa of Ovarian Follicles during Spontaneous and Induced Atresia in Ewes [J]. Biology of Reproduction, 1997, 56(4): 837-846.

[15] 吕嘉顺. 胰岛素对猪颗粒细胞黄体化的影响 [D]. 南宁: 广西大学, 2022.

[16] HU S Q, CAO W, YANG M J, et al. Molecular Characterization, Tissue Distribution, and Expression of Two Ovarian Dicer Isoforms during Follicle Development in Goose (Anser Cygnoides) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2014, 170: 33-41.

[17] MUELLER A C, SUN D, DUTTA A. The miR-99 Family Regulates the DNA Damage Response through Its Target SNF2H [J]. Oncogene, 2013, 32(9): 1164-1172.

[18] HU Y T, SHU Z Y, JIANG J H, et al. Torin2 Overcomes Sorafenib Resistance via Suppressing MTORC2-AKT-BAD Pathway in Hepatocellular Carcinoma Cells [J]. Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International, 2020, 19(6): 547-554.

[19] 蒋莉, 何芳, 刘丹, 等. Akt2-Bad 信号通路参与 NSCLC 凋亡 [J]. 西部医学, 2021, 33(3): 357-362.

责任编辑 王新娟