

沉默环状 RNA_{单酰甘油酯酶}促进睾丸支持细胞增殖而抑制凋亡^{*}

史圣甲^{1,2} 贾一凡¹ 季兴哲¹ 周梁¹ 张洲¹

(1. 西北妇女儿童医院生殖中心, 陕西 西安 710003; 2. 肿瘤生物学国家重点实验室·空军军医大学免疫学教研室, 陕西 西安 710032)

【摘要】 目的 探讨沉默环状 RNA_{单酰甘油酯酶}(Circular RNA_{monoglyceride lipase, circ_MGLL})表达对睾丸支持细胞增殖和凋亡的影响及潜在机制。方法 应用 siRNA 沉默睾丸支持细胞中 circ_MGLL 和 MGLL 的表达。应用 CCK-8 和 EdU 检测沉默 circ_MGLL 对支持细胞增殖能力的影响。应用流式细胞术检测沉默 circ_MGLL 对支持细胞周期和凋亡的影响。应用生信网站预测与 circ_MGLL 具有结合潜能的 miRNA。应用荧光素酶报告实验检测 circ_MGLL 与相关 miRNAs 的结合能力。结果 沉默 circ_MGLL 的表达后, 支持细胞增殖速度加快、增殖细胞比例和 S 期细胞比例升高(均 $P < 0.05$), 而凋亡细胞比例和 G1 期细胞比例降低($P < 0.05$)。机制方面研究显示, circ_MGLL 可结合 miR-1228、miR-1233、miR-149 和 miR-924。结论 circ_MGLL 可结合 miR-1228/miR-1233/miR-149/miR-924, 并促进睾丸支持细胞增殖而抑制细胞凋亡。

【关键词】 支持细胞; 环状 RNA_{单酰甘油酯酶}; 无精子症; 微小 RNA; 细胞增殖

【中图分类号】 R339.2⁺1; R697+.22 **【文献标志码】** A **DOI:**10.3969/j.issn.1672-3511.2022.02.006

Silencing circular RNA_{monoglyceride lipase} promotes the proliferation and inhibits apoptosis of sertoli cell in testis

SHI Shengjia^{1,2}, JIA Yifan¹, JI Xingzhe¹, ZHOU Liang¹, ZHANG Zhou¹

(1. Reproductive Center, Northwest Women's and Children's Hospital, Xian 710003, China;

2. State Key Laboratory of Tumor Biology, Department of Immunology, Air Force Medical University, Xian 710032, China)

【Abstract】 **Objective** To explore the effects and underlying mechanism of silencing circ_MGLL on the proliferation and apoptosis in sertoli cells. **Methods** Small interfering RNA (siRNA) was used to silence the expression of circ_MGLL in sertoli cells. CCK-8 and EdU were used to detect the effects of circ_MGLL on the proliferation in sertoli cells. Flow cytometry was used to detect the effects of circ_MGLL on the apoptosis and cell cycle distribution in sertoli cells. Bioinformatics website was used to predict the potential binding miRNAs of circ_MGLL. Luciferase reporter assays was used to detect the binding ability between circ_MGLL and miRNAs. **Results** After silencing the expression of circ_MGLL, the proliferating speed of sertoli cells were increased, the proportion of proliferating cells and cells at S stage were up-regulated, while the levels of apoptotic cells were decreased and cells at G1 stage were down-regulated. Mechanism study found circ_MGLL could bind with miR-1228, miR-1233, miR-149 and miR-924. **Conclusion** circ_MGLL binds with miR-1228/miR-1233/miR-149/miR-924, and inhibits cell proliferation and induces cell apoptosis.

【Key words】 Sertoli cells; Circular RNA_{clathrin heavy chain like 1}; Azoospermia; MicroRNA; Cell proliferation

精子发生是一个复杂而协调的过程^[1-2], 支持细胞是曲细精管中唯一的体细胞, 为精子发生通过提供必

需的结构、免疫和营养支持^[3-4]。支持细胞数目及功能异常将导致精子发生障碍, 在临床上多表现为唯支持细胞综合征(Sertoli cell-only syndrome, SCOS)^[3,5]。因此, 进一步探索支持细胞数目和功能的调控机制, 将有助于深入理解精子发生机制, 从而推动非梗阻性无精子症的诊疗进展。环状 RNA (circular RNA, circRNA) 是一类新近发现的内源性非编码 RNA^[6-7]。

基金项目: 国家自然科学基金(81771657)

通信作者: 周梁, 副教授, E-mail: worldfish@163.com

引用本文: 史圣甲, 贾一凡, 季兴哲, 等. 沉默环状 RNA_{单酰甘油酯酶}促进睾丸支持细胞增殖而抑制凋亡[J]. 西部医学, 2022, 34(2): 185-189, 194. DOI:10.3969/j.issn.1672-3511.2022.02.006

大量研究证实 circRNA 可通过多种机制调控关键基因的表达,在多种疾病的发生及进展中发挥着至关重要的作用^[8-9]。然而 circRNA 在精子发生及成熟中的功能尚不完全清楚。课题组前期文章发现非梗阻性无精子症和梗阻性无精子症患者睾丸组织中存在大量差异表达的 circRNA,并通过实时定量聚合酶链反应(RT-qPCR)证实环状_RNA0008045(Circbase ID: has_circ_0008045, circ_MGLL)在非梗阻性无精子症睾丸组织中的表达较梗阻性无精子症升高^[10],但具体功能仍待深入探索。因此,本研究进一步评估了 circ_MGLL 对支持细胞增殖及凋亡的影响,并探索了潜在机制,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验试剂 睾丸原代支持细胞(CP-H060RNA)及睾丸支持细胞专用完全培养基(CM-H060)购自武汉普诺赛公司。RNA 提取试剂盒、细胞计数试剂盒-8(Cell count kit-8, CCK-8)、细胞凋亡试剂盒、细胞周期试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。一步法 RT-qPCR 试剂盒购自北京康为世纪公司。Lipofectamine 2000 购自 Thermo Fisher 公司,EdU 细胞增殖试剂盒、si-circ_MGLL、si-正常对照(Normal control, NC)、miR-NC、miR-1228/miR-1233/miR-149/miR-924 类似物(mimics)购自广州锐博生物科技有限公司。

1.2 实验仪器 NanoDrop 紫外分光光度计购自 Thermo Fisher 公司,流式细胞仪购自 Beckman 公司,荧光定量 PCR 仪、多功能酶标仪购自 BIORAD 公司,荧光显微镜购自 OLYMPUS 公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞转染 将 50000 个支持细胞铺至 6 孔板,至细胞汇合度至 60%时,取 250 μ L 无血清培养基+5 μ L 小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)/miRNA/质粒制备试剂 I,取 250 μ L 无血清培养基+5 μ L Lipofectamine 2000 制备试剂 II。将试剂 I 和试剂 II 混合,孵育 15 min,而后逐滴滴加至细胞,5 h 后更换为完全培养基,48 h 后进行后续功能学实验。将转染 si-NC 的支持细胞命名为 si-NC 组,转染 si-circ_MGLL 的支持细胞命名为 si-circ_MGLL 组。

1.3.2 RNA 提取和一步法 RT-qPCR 胰酶消化 si-NC 组或 si-circ_MGLL 组细胞,1 mL 裂解液充分裂解 10 min,1 mL 注射器反复抽吸数次。加入 200 μ L 氯仿,震荡 15 s,室温放置 5 min,4 $^{\circ}$ C、13400 g 离心后,吸取水相层。加入 1/2 体积的乙醇,转移至吸附柱中,4 $^{\circ}$ C、13400 g 离心后加入 500 μ L 去蛋白液。4 $^{\circ}$ C、12000 g 离心后加入 500 μ L 漂洗液。4 $^{\circ}$ C、13400 g 再次离心去除残留试剂,加入 20 μ L 去 RNA 酶

ddH₂O,室温放置 2 min。4 $^{\circ}$ C、13400 g 离心,所得液体即为组织/细胞总 RNA,NanoDrop 测定 RNA 纯度与浓度。配制一步法 RT-qPCR 反应试剂:12.5 μ L 2 \times UltraSYBR Onestep Buffer, circ_MGLL/MGLL 或相应对照正义及反义引物各 0.5 μ L, UltraSYBR Onestep EnzymeMix 0.5 μ L, RNA 模板 1 μ L (100 ng),去 RNA 酶 ddH₂O 补齐至 25 μ L。震荡混匀后离心,上机检测,PCR 反应条件设定为反转录 45 $^{\circ}$ C 10 min,预变性 95 $^{\circ}$ C 5 min,变性 95 $^{\circ}$ C 10 s+退火/延伸 62 $^{\circ}$ C 45 s(35 个循环),4 $^{\circ}$ C 保存样品至检测结束。GAPDH 正义引物:5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3',反义引物:5'-GAAGATGGTGATGGGATTTCA-3';circ_MGLL 正义引物:5'-GCCTACCTGCTCATGGAGTT-3',反义引物:5'-AGACGGCATTTCAGCAGTTG-3';MGLL 正义引物:5'-ACAACCTTCAA GGTCCT-3',反义引物:5'-CGAGAGAGCACGCTG GAG-3'。GAPDH 做为内参,相对表达水平计算公式:2^{- $\Delta\Delta$ Ct}。

1.3.3 细胞计数试剂盒-8(CCK-8)检测细胞增殖速度 将 5000 个 si-NC 组和 si-circ_MGLL 组细胞铺至 96 孔板,每组设置 8 个副孔,共 5 个 96 孔板。过夜培养后,两组各取 1 板,向每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,酶标仪 450 nm 记录吸光度值,此时数据为第 0 天数据。而后每天同一时间两组各取 1 板细胞,重复上述步骤,获取第 1 至第 4 天吸光度值。根据两组吸光度值绘制细胞增殖曲线。

1.3.4 5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷(5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU)检测增殖细胞 si-NC 组和 si-circ_MGLL 组细胞加入 100 μ L EdU 培养基孵育 2 h。1 \times PBS 清洗 2 次后加入 50 μ L 甘氨酸,摇床孵育 5 min。1 \times PBS 清洗 2 次后加入 100 μ L Apollo 染色反应液,室温避光摇床孵育 30 min。1 \times PBS 清洗 2 次后加入 TrintonX-100 摇床孵育 10 min。1 \times PBS 清洗 2 次后加入 Hoechst 反应液,室温避光摇床孵育 30 min。1 \times PBS 清洗 2 次后,荧光显微镜拍照。

1.3.5 流式细胞术检测细胞的凋亡和周期 收集 si-NC 组和 si-circ_MGLL 组细胞,1 \times PBS 清洗 3 次,1 mL Binding buffer 悬浮细胞,调整细胞密度至 10⁶/mL。检测细胞凋亡:两组细胞加入 5 μ L Annexin-V FITC,室温避光孵育 10 min,而后加入 5 μ L PI,室温避光孵育 5 min。1 \times PBS 清洗 2 次,500 μ L PBS 重悬细胞,上机检测细胞凋亡。检测细胞周期:两组细胞加入 70%预冷乙醇 500 μ L 固定,4 $^{\circ}$ C 过夜。离心后,400 μ L PI 染色液混匀,4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min。1 \times PBS 清洗 2 次,500 μ L PBS 重悬细胞,上机检测细胞周期。

1.3.6 荧光素酶报告基因检测 circ_MGLL 和 miRNAs 结合关系 合成 circ_MGLL 全长序列,对荧光素酶报告载体 psiCHECK2 质粒进行 XhoI 和 NotI 酶切,将 circ_MGLL 插入 psiCHECK2 对应位点,所得载体即为 Luci-circ_MGLL。当支持细胞密度至 70% 时,将 Luci-circ_MGLL 与 miR-1228/miR-1233/miR-149/miR-924 mimics 共转染至支持细胞,根据共转染成分的不同分为五组:Luci-circ_MGLL + miR-NC 组、Luci-circ_MGLL + miR-1228 组、Luci-circ_MGLL + miR-1233 组、Luci-circ_MGLL + miR-149 组、Luci-circ_MGLL + miR-924 组。48 h 后,裂解各组细胞,向细胞裂解液中加入 100 μ L 萤火虫荧光素酶检测试剂,混匀后测定相对荧光强度。而后加入 100 μ L 海肾荧光素酶检测试剂,混匀后多功能酶标仪测定相对荧光强度。根据两次检测荧光强度的比值

计算各组相对荧光素强度。

1.4 统计学分析 实验数据统计分析及图像绘制采用 Graphpad Prism 8.0 软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间差异评估应用独立样本 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 沉默 circ_MGLL 表达促进支持细胞增殖 RT-qPCR 结果显示,si-circ_MGLL 可有效沉默支持细胞中呈环状结构 circ_MGLL 的表达,而对呈线性结构 MGLL 的表达无影响 ($P < 0.05$) (见图 1A)。CCK-8 结果显示,沉默 circ_MGLL 表达后,支持细胞增殖速度加快 ($P < 0.05$) (见图 1B)。EdU 结果显示,沉默 circ_MGLL 表达后,增殖细胞比例升高 ($P < 0.05$) (见图 1C、图 1D),以上结果提示 circ_MGLL 抑制支持细胞增殖。

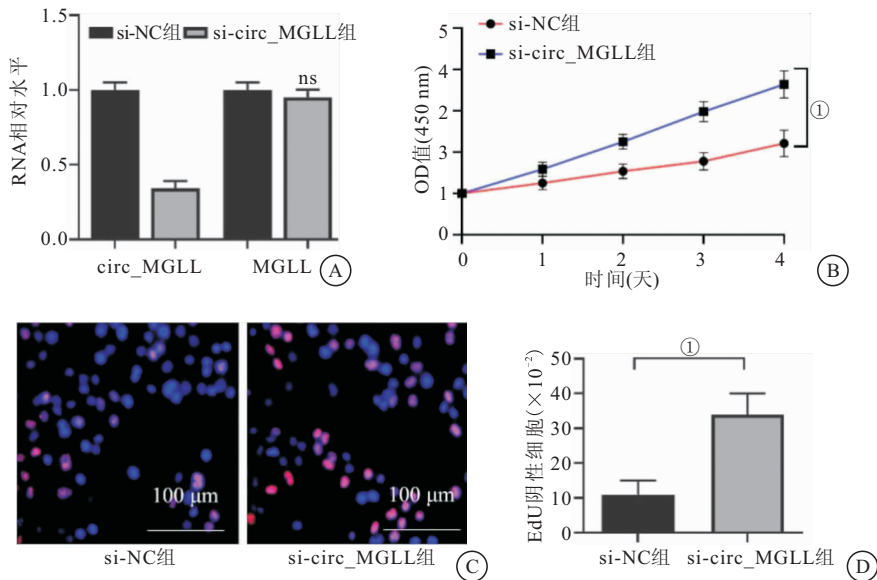


图 1 敲降 circ_MGLL 增强支持细胞增殖

Figure 1 Silencing circ_MGLL promotes sertoli cells

注: A. RT-qPCR 检测 si-circ_MGLL 沉默效率; B. CCK-8 实验检测支持细胞增殖速度; C. EdU 检测增殖细胞比例(荧光显微镜, 200 \times); D. 增殖细胞百分比的半定量分析。si-NC 组与 si-circ_MGLL 组比较, ① $P < 0.05$

2.2 沉默 circ_MGLL 表达抑制支持细胞凋亡 流式细胞术结果显示,沉默 circ_MGLL 表达后,支持细胞凋亡百分比降低 ($P < 0.05$) (见图 2A、图 2B), G1 期细胞百分比明显降低, S 期细胞百分比明显升高 ($P < 0.05$) (见图 2C、图 2D), 以上结果提示 circ_MGLL 促进支持细胞凋亡, 阻滞细胞周期于 G1 期。

2.3 circ_MGLL 可结合相关 miRNAs MiRanda、Targetsca 和 RNAhybird 网站联合预测 circ_MGLL 潜在结合的 miRNAs (见图 3A), 结果显示 miR-1228、miR-1233、miR-149、miR-924 和 circ_MGLL 具有较高的结合潜能 (见图 3B)。序列比对分析提示

circ_MGLL 与 miR-1228、miR-1233、miR-149、miR-924 存在结合位点 (见图 3C)。荧光素酶报告基因显示: Luci-circ_MGLL 与上述 miRNA 类似物共转染后, 相对荧光强度较 miR-NC 共转染组明显降低 ($P < 0.05$) (见图 3D), 以上结果提示 circ_MGLL 可吸附并结合上述 miRNAs。

3 讨论

支持细胞可为生殖细胞提供其分化及成熟必需的营养及免疫豁免微环境, 其数目和功能异常将导致精子发生障碍^[4, 11-13]。既往研究已初步证实非编码 RNA 可通过多种机制影响睾丸支持细胞的数目和功

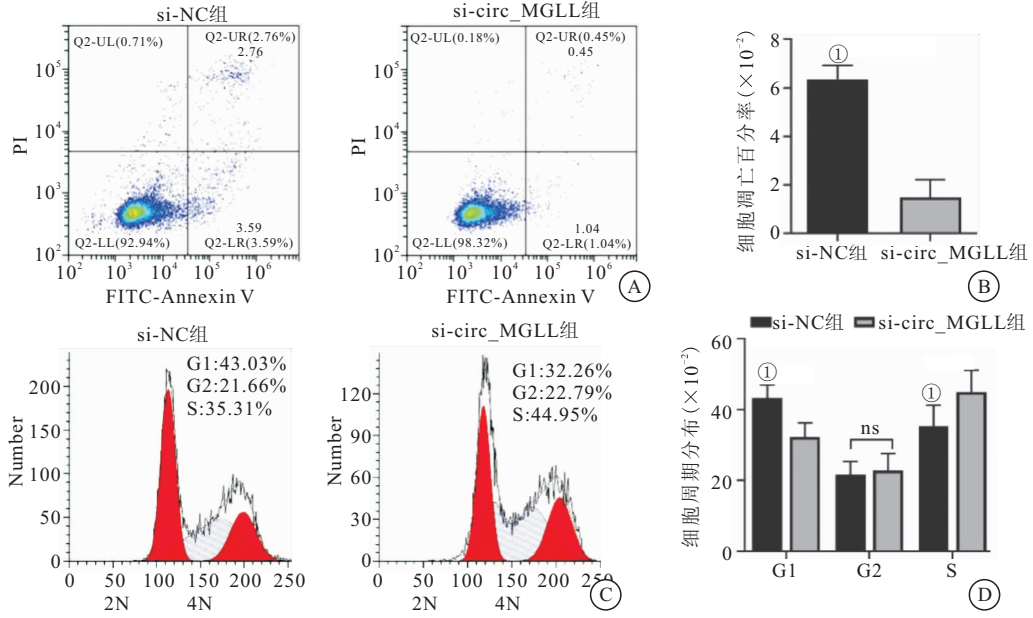


图2 敲降 circ_MGLL 抑制支持细胞凋亡

Figure 2 Silencing circ_MGLL inhibits cell apoptosis in sertoli cells

注: A. 流式细胞术检测支持细胞凋亡水平; B. 凋亡细胞百分比的定量分析; C. 流式细胞术检测支持细胞周期分布; D. 细胞周期分布的定量分析。与 si-circ_MGLL 组比较, ①P<0.05

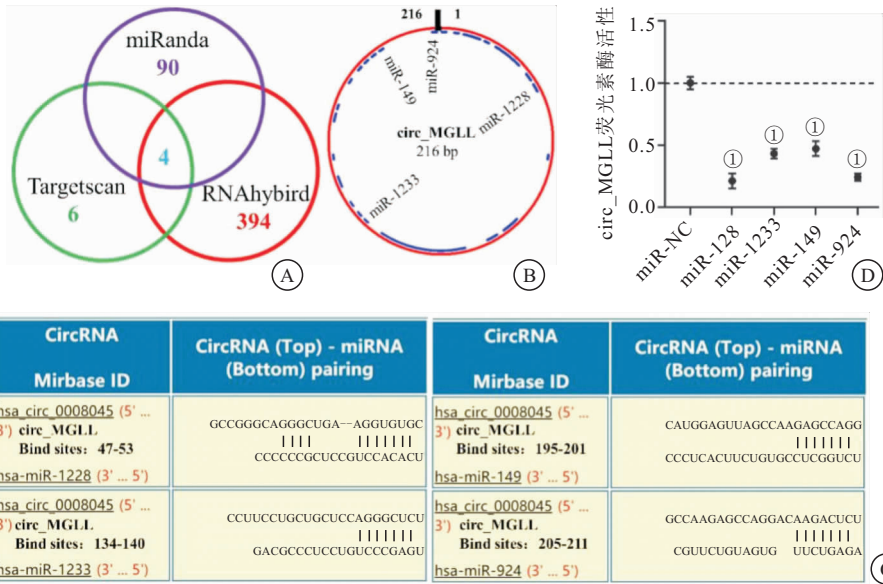


图3 circ_MGLL 潜在结合 miRNAs

Figure 3 The putative binding miRNAs of circ_MGLL

注: A. 生信网站预测 circ_MGLL 潜在结合 miRNAs; B. miR-149/924/1228/1233 是 circ_MGLL 的潜在结合 miRNAs; C. circ_MGLL 与 miR-149/924/1228/1233 的结合位点; D. 荧光素酶报告基因检测 Luci-circ_MGLL 与 miR-1228/miR-1233/miR-149/miR-924 共转染后相对荧光强。与 miR-NC 比较, ①P<0.05

能而调控精子发生^[14-16]。如 miR-4270 通过靶向抑制生长停滞与 DNA 损伤诱导基因 α(Growth arrest and DNA damage inducible alpha, GADD45A) 的表达, 而抑制人和小鼠支持细胞增殖并促进其凋亡, 从而导致精子发生障碍^[17]。另有研究^[18]发现 miR-202 在非梗阻性无精子症睾丸组织中表达升高, 并抑制细胞增殖

和生物合成功能。课题组前期研究也发现 circ_0000116 在非梗阻性无精子症睾丸组织中表达上调, 并可作为竞争性内源性 RNA(Competing endogenous RNA, ceRNA) 吸附 miR-449a 而抑制精子发生^[19]。因此, 进一步鉴定与支持细胞数目与功能相关的非编码 RNA, 将有助于推动无精子症诊疗进展。

课题组还发现非梗阻性无精子症和梗阻性无精子症患者睾丸组织中存在大量差异表达的 circRNA, 其中 circ_0023313、circ_0008045 (circ_MGLL)、circ_00058058 在非梗阻性无精子症睾丸组织中表达升高, 而 circ_0061817、circ_00002023、circ_00008533 在非梗阻性无精子症组织中表达下降^[10]。其中尚无研究探讨来源于单酰甘油酯酶(MGLL)第 7 外显子的 circ_RNA0008045 (Circbase ID: has_circ_0008045, circ_MGLL) 在睾丸组织中的表达及功能。因此选取 circ_MGLL 作为本研究的后续研究对象, 结果显示: 沉默 circ_MGLL 的表达将导致支持细胞增殖能力增加、而凋亡水平降低。因此, 推测异常升高的 circ_MGLL 将诱导支持细胞凋亡, 而支持细胞数目异常将导致精子发生障碍, 这可能是非梗阻性无精子症的发病机制之一。

近年来, 研究证实 ceRNA 机制是 circRNA 调控相关致病基因表达最常见的一种形式。circRNA 可通过吸附并结合相关 miRNAs, 从而解除 miRNAs 对下游靶基因转录的抑制, 进而参与调控相关疾病的发生及进展^[20-21]。为了深入揭示 circ_MGLL 调控支持细胞增殖和凋亡的机制, 本研究初步探索了 circ_MGLL 是否具有作为 ceRNA 的潜能。通过三个生物信息学网站^[22-24]和荧光素酶报告基因实验, 我们发现 circ_MGLL 可结合 miR-1228、miR-1233、miR-149、miR-924。既往研究显示 miR-1228 在乙二醇甲醚暴露的动物睾丸中表达升高, 并与细胞凋亡和分化密切相关^[25]。此外, miR-1233 可被证实可通过抑制双特异性磷酸酶 9 (Dual-Specificity Phosphatase 9, DUSP9) 的表达而抑制凋亡^[26]。研究还发现, miR-149 是精子功能的重要调控因子, 其在人类胚胎早期发育过程中发挥重要功能^[27]。因此, circ_MGLL 可能通过结合上述 miRNAs 并抑制其相关功能, 从而实现对睾丸支持细胞增殖和凋亡的调控。

本研究仅探索了 circ_MGLL 在睾丸支持细胞中的表达及功能, 尚缺少大样本的无精子症患者睾丸组织标本的验证性实验。此外对 circ_MGLL 调控支持细胞增殖和凋亡机制的相关探索较为粗浅。尽管发现了一系列凋亡相关 miRNAs 是 circ_MGLL 的潜在结合因子, 但仍需更深入的研究阐述相关 miRNAs 是否可介导 circ_MGLL 对支持细胞增殖和凋亡的调控。

4 结论

本研究结果发现, 沉默 circ_MGLL 表达促进睾丸支持细胞增殖并抑制凋亡, 并可吸附结合 miR-1228/miR-1233/miR-149/miR-924。本研究初步探索了 circ_MGLL 对睾丸支持细胞增殖的调控机制, 为非梗

阻性无精子症提供了潜在的诊疗靶点。

【参考文献】

- [1] 张友旺, 刘俊, 马开槐, 等. 自噬对精子发生及活力的影响[J]. 中华男科学杂志, 2019, 25(1): 72-76.
- [2] 宋兵, 曹云霞. miRNAs 与精子发生研究进展[J]. 中国优生与遗传杂志, 2017, 25(9): 1-4.
- [3] 邵帅, 江梅, 姜经航, 等. 褪黑素对顺铂诱导的小鼠睾丸支持细胞 TM4 损伤保护作用机制[J]. 医学研究生学报, 2020, 33(11): 1140-1144.
- [4] 易晓东, 张怡宁, 肖帅, 等. 支持细胞糖代谢在精子发生中的作用及调控机制的研究进展[J]. 中华男科学杂志, 2019, 25(10): 923-927.
- [5] PENA V N, KOHN T P, HERATI A S, *et al.* Genetic mutations contributing to non-obstructive azoospermia [J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2020, 34(6): 101479.
- [6] 申倩倩, 王焱, 王晓, 等. 沉默环状 RNA hsa_circ_0011021 表达对宫颈癌细胞增殖迁移及侵袭的影响[J]. 西部医学, 2019, 31(9): 1339-1343.
- [7] 杨莹莹, 孙靓, 毛康琳, 等. circFNDC3B 通过抑制 miR-147 表达促进恶性黑色素瘤迁移与侵袭[J]. 西部医学, 2020, 32(11): 1565-1569.
- [8] CHEN L L. The expanding regulatory mechanisms and cellular functions of circular RNAs [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(8): 475-490.
- [9] MEHTA S L, DEMPSEY R J, VEMUGANTI R, *et al.* Role of circular RNAs in brain development and CNS diseases [J]. *Prog Neurobiol*, 2020, 186: 101746.
- [10] GE P, ZHANG J, ZHOU L. CircRNA expression profile and functional analysis in testicular tissue of patients with non-obstructive azoospermia [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2019, 17(1): 100.
- [11] 罗芳, 李朝晖, 赵小阳. 精原干细胞的自我更新及分化调控的研究现状与展望[J]. 发育医学电子杂志, 2020, 8(4): 378-384.
- [12] NI F D, HAOS L, YANG W X, *et al.* Multiple signaling pathways in Sertoli cells: recent findings in spermatogenesis [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(8): 541.
- [13] 谭琨, 张培海, 黄晓朋, 等. 睾丸支持细胞的研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(38): 52-54.
- [14] 夏蒙蒙, 申雪芹, 牛长敏, 等. MicroRNA 参与调控睾丸支持细胞的增殖与粘附功能[J]. 遗传, 2018, 40(9): 724-732.
- [15] JOSHI M, RAJAENDER S. Long non-coding RNAs (lncRNAs) in spermatogenesis and male infertility [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2020, 18(1): 103.
- [16] 张丽虹, 王锋, 赵小贞, 等. MicroRNA-181d-5p 通过 PTEN 参与睾丸支持细胞间紧密连接损伤[J]. 解剖学杂志, 2021, 44(02): 95-100.
- [17] WANG H, HUANG Z, ZHAO X, *et al.* miR-4270 regulates cell proliferation and apoptosis in patients with Sertoli cell-only syndrome by targeting GADD45A and inactivating the NOTCH signaling pathway [J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(9): 5730-5740.

- [5] 吕耀中,宗绍波,李芳,等. 散结镇痛胶囊对慢性盆腔炎大鼠抗炎及抗纤维化研究[J]. 中草药,2019,50(20):5011-5017.
- [6] BUGG C W, TAIRA T. Pelvic Inflammatory Disease: Diagnosis And Treatment In The Emergency Department[J]. Emerg Med Pract,2016,18(12):1-24.
- [7] CHIANG B J, KUO H C, LIAO C H. Can Botulinum Toxin A Still Have a Role in Treatment of Lower Urinary Tract Symptoms/Benign Prostatic Hyperplasia Through Inhibition of Chronic Prostatic Inflammation[J]. Toxins (Basel),2019,11(9):547.
- [8] 谢紫焯,黄政海,俞婵娟,等. 康妇消炎栓治疗慢性盆腔炎模型大鼠药效学研究[J]. 中成药,2018,40(12):2747-2750.
- [9] 岳秀永,秦建设,方应权,等. 表没食子儿茶素没食子酸酯对慢性盆腔炎大鼠子宫组织的影响[J]. 中成药,2018,40(5):1182-1184.
- [10] PAN L, MA X K, ZHAO P F, *et al.* Weeping forsythia extract alleviates dexamethasone-induced oxidative injury of breast muscles in broilers[J]. Animal,2019,13(11):2660-2668.
- [11] 孙佳玮,戴素丽,李磊,等. 连翘根提取物(FSEER)对化疗后小鼠骨髓和免疫抑制的影响[J]. 中国免疫学杂志,2015,(5):625-628.
- [12] 陈诚. 连翘提取物可有效缓解力竭运动导致的骨骼肌组织氧化损伤[J]. 基因组学与应用生物学,2018,37(1):53-58.
- [13] 武明红,张海燕,路燕. 连翘炎宁合剂联合物理疗法对慢性盆腔炎患者治疗效果的影响[J]. 中外女性健康研究,2019,(3):82,84.
- [14] 刘玉玲,汪栋材,陈博勉,等. 王孟庸运用当归连翘赤小豆汤加味验案举隅[J]. 中国中医药信息杂志,2019,26(6):118-120.
- [15] BUFFONE A J R, ANDERSON N R, HAMMER D A. Human Neutrophils Will Crawl Upstream on ICAM-1 If Mac-1 Is Blocked[J]. Biophys J,2019,117(8):1393-1404.
- [16] LENNARTZ F, SMITH C, CRAIG A G, *et al.* Structural insights into diverse modes of ICAM-1 binding by Plasmodium falciparum-infected erythrocytes[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2019,116(40):20124-20134.
- [17] BENEDICTO A, HERRERO A, ROMAYOR I, *et al.* Liver sinusoidal endothelial cell ICAM-1 mediated tumor/endothelial crosstalk drives the development of liver metastasis by initiating inflammatory and angiogenic responses[J]. Sci Rep,2019,9(1):13111.
- [18] HU H, CHEN E, LI Y, *et al.* Effects of Arsenic Trioxide on INF-gamma Gene Expression in MRL/lpr Mice and Human Lupus[J]. Biol Trace Elem Res,2018,184(2):391-397.
- [19] 张志鹏,高升,任存霞. 当归芍药散对慢性盆腔炎模型大鼠分子免疫调控的影响[J]. 中华中医药学刊,2015,33(11):2684-2686.

(收稿日期:2019-11-26;修回日期:2021-10-09;编辑:王小菊)

(上接第 189 页)

- [18] YANG C, YAO C, TIAN R, *et al.* miR-202-3p Regulates Seroli Cell Proliferation, Synthesis Function, and Apoptosis by Targeting LRP6 and Cyclin D1 of Wnt/ β -Catenin Signaling [J]. Mol Ther Nucleic Acids,2019,14:1-19.
- [19] LV M Q, ZHOU L, GE P, *et al.* Over-expression of hsa_circ_0000116 in patients with non-obstructive azoospermia and its predictive value in testicular sperm retrieval [J]. Andrology,2020,8(6):1834-1843.
- [20] REN S, LIN P, WANG J, *et al.* Circular RNAs: Promising Molecular Biomarkers of Human Aging-Related Diseases via Functioning as an miRNA Sponge[J]. Mol Ther Methods Clin Dev,2020,6(18):215-229.
- [21] LIN W, LIU H, TANG Y, *et al.* Circular RNAs: Promising Molecular Biomarkers of Human Aging-Related Diseases via Functioning as an miRNA Sponge [J]. Mol Cell Biochem,2021,476(1):109-123.
- [22] AGARWAL V, BELL G W, NAM J W, *et al.* Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs [J]. Elife,2015,4:e05005.
- [23] LIN W, LIU H, TANG Y, *et al.* Circular RNAs: Promising Molecular Biomarkers of Human Aging-Related Diseases via Functioning as an miRNA Sponge [J]. RNA,2004,10(10):1507-1517.
- [24] QUILLET A, SAAD C, FERRY, *et al.* Improving Bioinformatics Prediction of microRNA Targets by Ranks Aggregation [J]. Front Genet,2020,10:1330.
- [25] KEN SAKURAI, KEI MIKAMOTO, MAKOTO SHIRAI, *et al.* MicroRNA profiling in ethylene glycol monomethyl ether-induced monkey testicular toxicity model [J]. J Toxicol Sci,2015,40(3):375-382.
- [26] WANG Y, ZANG R K, DU Y N. HSA_CIRC_0004050 on proliferation and apoptosis of A549 cells through ERK/JNK signaling pathway [J]. J Biol Regul Homeost Agents,2020,34(6):2037-2047.
- [27] LI H, LI L, LIN C, *et al.* Decreased miR-149 expression in sperm is correlated with the quality of early embryonic development in conventional in vitro fertilization [J]. Reprod Toxicol,2021,101:28-32.

(收稿日期:2021-04-18;修回日期:2021-11-01;编辑:王小菊)