



KLF5抑制氧化应激状态下猪卵泡颗粒细胞中 miR-370与miR-219a的转录

郭震楠¹, 吕世政¹, 萧宗贤¹, 吴启吉¹, 包雨加¹, 李 清¹, 李齐发¹, 李琦琦², 杜 星^{1*}

(1. 南京农业大学动物科技学院, 南京 210095; 2. 江苏农林职业技术学院畜牧兽医学院, 镇江 212400)

摘要: 旨在探究猪卵泡颗粒细胞中miR-370和miR-219a响应氧化应激的表达模式及调控机制, 为研发内源性小分子调节物抑制氧化应激、促进卵泡发育提供理论依据。本研究以原代猪卵泡颗粒细胞为试验材料, 利用150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 构建体外氧化应激模型。结合RNA-seq与RT-qPCR试验明确氧化应激对miR-370和miR-219a转录的调控作用。基于生物信息学分析和组织表达谱构建鉴定二者保守性和组织表达分布。利用FACS和ELISA试验鉴定二者对颗粒细胞氧化应激和凋亡的影响。构建猪KLF5表达载体, 通过WB试验鉴定表达效率, 进一步结合RT-qPCR、荧光素酶活性检测和ChIP等试验鉴定KLF5抑制氧化应激状态下颗粒细胞中miR-370和miR-219a转录的机制。结果表明, 氧化应激抑制miR-370和miR-219a转录, 导致二者初体、前体和成熟表达水平均极显著下调($P<0.01$)。特征分析发现二者高度保守且在卵巢组织高表达。相关性分析发现二者表达水平与SOD活性呈极显著正相关($P<0.01$), 与MDA水平呈极显著负相关($P<0.01$), 提示二者具有抗氧化功能。过表达二者可有效缓解氧化应激引起的ROS累积、低SOD活性、高MDA水平和高凋亡率, 且二者功能存在协同效应。预测发现二者启动子区存在转录因子KLF5结合位点, 过表达KLF5极显著抑制二者转录和启动子活性($P<0.01$), 但对结合位点突变型报告载体的荧光素酶活性并无显著影响。进一步通过ChIP证实KLF5与二者启动子区直接结合, 且氧化应激可提高其结合丰度。综上所述, 氧化应激通过促进KLF5的表达与转录因子活性抑制具有抗氧化功能的miR-370和miR-219a转录, 加剧颗粒细胞氧化损伤。

关键词: 猪; 卵泡颗粒细胞; 氧化应激; miRNA; KLF5

中图分类号: S828.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)01-0234-12

KLF5 Inhibits the Transcription of miR-370 and miR-219a in Sow Follicular Granulosa Cells under Oxidative Stress

GUO Zhennan¹, LÜ Shizheng¹, XIAO Zongxian¹, WU Qiji¹, BAO Yujia¹, LI Qing¹, LI Qifa¹,

LI Qiqi², DU Xing^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Jiangsu Vocational College of Agriculture and Forestry, Zhenjiang 212400, China)

Abstract: The aim of this study was to investigate the expression pattern and regulatory mechanism of miR-370 and miR-219a in sow follicular granulosa cells (GCs) under oxidative stress, and provide theoretical basis for the use of endogenous small molecule regulators to inhibit oxidative stress and promote follicular development. In this study, primary sow GCs were used as experimental materials

收稿日期: 2025-06-03

基金项目: 国家自然科学基金(32372839); 江苏省自然科学基金(BK20231475)

作者简介: 郭震楠, 硕士, 主要从事表观遗传调控研究, E-mail: gzn@stu.njau.edu.cn

* 通信作者: 杜 星, 副研究员, 主要从事动物遗传育种与表观遗传调控研究, E-mail: duxing@njau.edu.cn

and an *in vitro* oxidative stress GC model was established using $150 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$. The regulatory effect of oxidative stress on the transcription of miR-370 and miR-219a was analyzed by RNA-seq and RT-qPCR. Their conservation and expression distribution were detected by bioinformatics analysis and tissue expression profiling. FACS and ELISA were performed to detect the effect of two miRNAs on the oxidative stress and apoptosis of sow GCs. The overexpression plasmid of *KLF5* was constructed and its expression efficiency was verified by WB. Furthermore, RT-qPCR, luciferase activity analysis and ChIP were conducted to identify the mechanism by which *KLF5* inhibits the transcription of two miRNAs in sow GCs under oxidative stress. The results showed that, oxidative stress inhibits the transcription of miR-370 and miR-219a, resulting in down-regulation of their pri-, pre- and mature expression levels ($P<0.01$). Characterization analysis revealed that both miRNAs are conserved and highly expressed in ovary. Correlation analysis revealed that their expression levels were significantly positively correlated with SOD activity ($P<0.01$), significantly negatively correlated with MDA level ($P<0.01$), suggesting that they have anti-oxidative capacity. Overexpression of two miRNAs effectively and synergistically alleviated the oxidative stress-induced ROS accumulation, low SOD activity, high MDA levels, and high apoptosis rate. Prediction analysis found that their promoters contain potential *KLF5* binding sites, and overexpression of *KLF5* significantly inhibited their transcription and promoter activities ($P<0.01$), while had no effect on the luciferase activities of the reporter vectors containing mutant *KLF5* binding sites. ChIP results confirmed that *KLF5* directly bound to their promoters, and its expression and binding enrichment were elevated by oxidative stress. In summary, oxidative stress inhibits the transcription of antioxidant miRNAs (miR-370 and miR-219a) by inducing the expression and transcription factor activity of *KLF5*, which exacerbates the oxidative damage of sow GCs.

Keywords: sow; follicular granulosa cells; oxidative stress; miRNA; *KLF5*

* **Corresponding author:** DU Xing, E-mail: duxing@njau.edu.cn

卵泡发育对于维持雌性哺乳动物排卵等生殖活动至关重要^[1],且已被证实是包括母猪在内多种畜禽繁殖力形成早期的主要内源决定因素之一^[2]。卵泡发育命运(成熟排卵或闭锁退化)直接决定了母猪繁殖力的高低^[3-4],并在一定程度上影响了养猪业的经济效益。目前研究表明颗粒细胞(granulosa cells, GC)的正常状态(增殖)和功能(类固醇激素合成)是卵泡健康发育的前提,而其状态或功能异常则导致卵泡闭锁,甚至引发不孕不育和生殖障碍类疾病^[5-10]。因此,解析颗粒细胞状态和功能的调控机制对于鉴定卵泡发育关键因子、提高母猪繁殖力意义重大。

作为体内普遍存在的生理现象,氧化应激(oxidative stress)是响应体内外多种应激刺激的共同作用机制^[11]。其功能具有双向性,即适度氧化应激有助于维持机体免疫、信号转导、能量代谢和细胞适应性,而严重氧化应激则引起活性氧簇(ROS)

过量产生,造成氧化还原系统失衡,导致氧化损伤并引发衰老和相关疾病^[12-15]。研究发现,卵泡快速发育过程中微环境剧烈变化(缺氧和激素刺激等)导致氧化应激可引起卵泡液中抗氧化物含量降低、氧化损伤标志物水平升高,这不利于颗粒细胞增殖和卵母细胞发育^[16]。体内外试验证实,过量ROS累积引起颗粒细胞和卵母细胞氧化应激损伤,通过抑制颗粒细胞类固醇激素合成阻碍卵泡发育,并通过影响卵母细胞成熟和质量降低其受精能力和胚胎发育潜力^[17-18]。在猪卵泡中,相关研究发现氧化应激也可造成类似影响^[19],且团队前期研究证实氧化应激不仅损害颗粒细胞正常状态和功能,还会引起转录组发生剧烈变化,其中包含一系列差异表达的miRNAs^[20]。然而,这些miRNAs响应氧化应激的表达调控机制尚不清楚,其在猪卵泡颗粒细胞中是否具有调控氧化应激的功能仍需进一步探索。

基于上述发现,本研究首先构建猪卵泡颗粒细

胞体外氧化应激模型,随后联合生物信息学分析和多种分子生物学方法鉴定关键 miRNAs 的抗氧化功能,同时探究其响应氧化应激的表达模式与转录调控机制,以期利用内源性小分子调节物抑制氧化应激、促进卵泡发育和改善母猪繁殖力提供理论依据和实践靶点。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用杜长大三元母猪源自江苏省南京市竹顺生物科技有限公司,随机选择 80 头 180 d 且体重约为 100 kg 的健康母猪,屠宰后收集双侧卵巢用于颗粒细胞分离与体外培养。另外随机选择 3 头猪分别采集心、肝、脾、肺、肾、脂肪、肌肉和卵巢组织并置于液氮罐中保存。

主要试剂:DMEM/F12 培养基、胎牛血清 FBS、青链霉素、PBS、Opti-MEM 培养基购自 Gibco; LipofectamineTM3000 转染试剂购自 Roche; H₂O₂ 购自国药集团化学试剂有限公司; PCR 扩增酶、DH5 α 感受态菌株购自南京擎科生物科技有限公司; 无内毒素质粒试剂盒购自北京天根生化科技有限公司; cDNA 反转录试剂盒、定量 PCR 试剂盒、细胞凋亡检测试剂盒、荧光素酶报告基因检测试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; Western 与 IP 细胞裂解液以及 ROS、SOD 和 MDA 检测试剂盒购自上海碧云天生物科技股份有限公司; KLF5 抗体购自上海生物工程股份有限公司(货号: D260534); GAPDH 抗体购自 ORIGENE 公司(货号: TA802519); 引物合成和 DNA 测序由上海生物工程股份有限公司完成; miRNA mimics 交由上海吉玛制药技术有限公司合成。

1.2 细胞培养、处理与转染

利用预热的 75% 乙醇和生理盐水反复轻柔冲洗新鲜采集的猪卵巢组织,以彻底去除表面血渍及潜在的残留污染源。分离 3~5 mm 直径健康卵泡中的颗粒细胞并将其接种于含 1% 青链霉素和 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基中,置于含 5% CO₂ 的 37 °C 湿式培养箱中培养 36~48 h,待细胞牢固贴壁且密度达到 90% 时进行消化并接种于 6 孔板中继续培养 16 h,待细胞密度达到 70% 左右时进行相应处理与转染。

为构建猪卵泡颗粒细胞体外氧化应激模型,细胞牢固贴壁后更换为无血清 DMEM/F12 培养基培

养 12 h,随后加入终浓度为 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 H₂O₂ 继续培养 2 h 直至在电镜下观察到细胞形态学发生明显变化,对照组则加入等量 PBS,每组设置 3 个重复孔。细胞形态变化的判定依据如下,正常颗粒细胞具有稳定细胞形态,边缘清晰平滑且无明显锯齿状,细胞未破碎或内部产生液泡。反之,氧化应激状态下的颗粒细胞轮廓不清晰,细胞边缘呈锯齿状,内部产生大量液泡,丧失正常形态甚至出现细胞破碎的现象。

细胞转染按照 LipofectamineTM3000 转染试剂说明书提供方法进行,利用 Opti-MEM 培养基分别稀释被转染物(质粒或 miRNA mimics)和转染试剂,充分混匀后室温孵育 15 min,随后逐滴加入细胞中继续培养 48 h,每组设置 3 个重复孔。质粒转染体系为每孔 1.6 μg , miRNA mimics 转染细胞终浓度为 100 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。本研究涉及的 mimics 序列信息如下, mimic NC: TTCTCCGAACGTGTCACGTTT; miR-370 mimic: GCCTGCTGGGGTGAACCTGGT; miR-219a mimic: AGAGTTGAGTCTGGACGTCCCG。

1.3 生物信息学分析

利用 NCBI GenBank 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 查询不同物种 miR-370 和 miR-219a 的初体、前体和成熟序列以及猪 KLF5 基因编码序列。通过 Ensembl 数据库 (<http://www.ensembl.org/index.html>) 查询不同物种 miR-370 和 miR-219a 的染色体定位和邻近编码基因。颗粒细胞氧化应激转录组测序数据来源于团队前期研究^[20]。猪 miRNAs 组织表达高通量数据来源于 Chen 等^[21]的研究。利用 JASPAR 数据库 (<http://jaspar.genereg.net/>) 分析猪 miR-370 和 miR-219a 启动子上潜在的转录因子结合位点。

1.4 RNA 提取与反转录定量 PCR(RT-qPCR)

利用 Trizol 法提取猪不同组织和体外培养卵泡颗粒细胞的总 RNA,质检合格后选取 1 μg 总 RNA 进行反转录,反转录程序按照诺唯赞 cDNA 合成试剂盒说明书提供步骤进行,成熟 miRNAs 的反转录依赖特异性茎环引物。利用 Primer 5.0 软件设计定量引物,经检测合格后进行 qPCR 反应,反应体系和程序参考霍泱安等^[22]的方法进行。反应结束后获得原始数据并通过 $-2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算目的基因的相对表达水平, GAPDH 和 U6 分别作为 KLF5 和 miRNAs 的内参基因。本研究所涉及引物序列见表 1。

表 1 本研究涉及的引物序列信息

Table 1 The sequence information of primers involved in this study

引物 Primer	引物序列(5'→3') Sequence	片段 长度/bp Length	用途 Usage
miR-370 stem-loop	CTCAACTGGTGTCTGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGACCAGGTT	—	成熟 miRNAs 反转录
miR-219a stem-loop	CTCAACTGGTGTCTGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCGGGACGT	—	
miR-7136 stem-loop	CTCAACTGGTGTCTGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGGCTCCACA	—	
miR-9860 stem-loop	CTCAACTGGTGTCTGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGGCGGTCCA	—	
Mature miR-370-F	GCCGAGGCCTGCTGGGGTGG	64	成熟 miRNAs 定量 PCR
Mature miR-219a-F	GCCGAGAGAGTTGAGTCTGG	64	
Mature miR-7136-F	GCCGAGTCTGGTCCAGACAC	64	
Mature miR-9860-F	GCCGAGTTGCCCGAGAGCT	64	
Common miRNA-R	CTCAACTGGTGTCTGTGA	—	初级 miRNAs 定量 PCR
Pri-miR-370-F	TCTCGAATCAGATTGGTGGC	145	
Pri-miR-370-R	CAGGCACTCGTGAGCTGTGTA	140	
Pri-miR-219a-F	TCAGACATTCGGCCCCCTTGT		
Pri-miR-219a-R	CTCGAGAATTGCGTTTGGAC	75	前体 miRNAs 定量 PCR
Pre-miR-370-F	AAGACAGAGAAGCCAGGTCAC		
Pre-miR-370-R	GACAGACCAGGTTCCACCCC		
Pre-miR-219a-F	CCGCGGCTCTTGATTGTC		
Pre-miR-219a-R	GCTCGGGACGTCCAGACT	76	荧光素酶 报告载体 构建
miR-370 promoter-F	<u>CGGGGTACCC</u> GACGAGCTAATGTATGCTGA	314	
miR-370 promoter-R	<u>CCGCTCGAGT</u> CTGTGATATCGCCGTGTCTATA	320	
miR-219a promoter-F	<u>CGGGGTACCC</u> CACGGACTGAAGGAGAGGA		
miR-219a promoter-R	<u>CCGCTCGAGC</u> ACAAGGGGCCGAATGTCT	150	染色质免 疫沉淀
miR-370 promoter-F1	AACGACCCTCCGCTGCTG		
miR-370 promoter-R1	CTCCCACCGCCACCCCTG	200	
miR-219a promoter-F2	TCCCCGTCCCCTTCCTT		
miR-219a promoter-R2	CATGCGGAAGCAGGGAC		

下划线碱基为酶切位点与保护碱基

The underlined bases are restriction sites and protected bases

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡率与 ROS 水平

收集 2×10^5 个经处理或转染培养完成后的颗粒细胞,加入 500 μ L 预冷 $1 \times$ Binding Buffer 轻柔重悬,随后依次加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L PI,轻柔混匀后室温避光孵育 10 min,孵育完成后使用流式细胞仪检测细胞凋亡率(Q2 和 Q3 细胞百分率)。

细胞 ROS 水平检测过程如下,利用无血清培养基稀释 DCFH-DA 并加入处理或转染培养完成后的颗粒细胞中,置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 30 min,孵育完成后利用无血清培养基轻柔冲洗 3 次去除未进入细胞的 DCFH-DA,最后使用流式细胞仪检测细胞内 ROS 水平。

1.6 ELISA 检测 SOD 活性与 MDA 水平

将处理或转染完成后的颗粒细胞进行裂解,离心后收集细胞上清液,通过 BCA 法检测蛋白浓度,分别按照碧云天超氧化物歧化酶(SOD)活性检测试剂盒和脂质氧化丙二醛(MDA)水平检测试剂盒中说明书提供方法进行定量检测分析。

1.7 载体构建与荧光素酶活性检测

委托上海生物工程股份有限公司根据猪 *KLF5* 编码序列(NM_001097489)合成其全长 DNA 序列,在 T4 连接酶的作用下与线性化 pcDNA3.1(+)载体进行连接并转化至 DH5 α 感受态细胞中,后经涂板、挑取单克隆以及 Sanger 测序最终获得阳性重组

质粒,并将其命名为 pcDNA3.1-KLF5;设计引物扩增包含野生型 KLF5 潜在结合位点的 miR-370 和 miR-219a 启动子序列,双酶切后在 T4 连接酶的作用下与线性化 pGL3-Basic 载体进行连接,经转化、涂板、单克隆测序最终获得野生型报告载体(WT)。以野生型报告载体为模板,通过诺唯赞同源重组试剂盒提供的方法对 KLF5 潜在结合位点进行定点突变,经单克隆测序最终获得突变型报告载体(MT)。所用引物序列见表 1。

收集处理或转染完成后的颗粒细胞,利用诺唯赞荧光素酶报告基因检测试剂盒提供的方法分别检测各样本中萤火虫荧光活性与海肾荧光活性。相对荧光活性定义为萤火虫荧光活性与海肾荧光活性的比值。每组包含 3 个独立重复样本。

1.8 蛋白印迹试验(Western blot)

使用预冷 PBS 清洗细胞 3 次,加入细胞裂解液并置于冰上静置 30 min,刮取细胞裂解物并在 4℃ 环境下 $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,离心结束后收集蛋白上清液。通过 BCA 法检测蛋白浓度,经过变性处理后按每孔 15 μg 蛋白上样量进行 SDS-PAGE 电泳,电泳结束后在冰浴条件下将蛋白转印至 PVDF 膜,随后浸入封闭液室温轻摇封闭 2 h,加入目标蛋白抗体(1:1 000 稀释)并置于 4℃ 环境中静置过夜,次日使用 TBST 清洗 3 次后加入对应 IgG-HRP 二抗(1:2 000 稀释)进行孵育。室温孵育 1.5 h 后滴加 ECL 显色液,反应 1~3 min 后置于化学发光仪中进行蛋白印迹成像拍照。

1.9 染色质免疫沉淀(ChIP)

ChIP 试验具体过程参考团队前期研究的方法进行^[23]。经 1% 甲醛溶液交联颗粒细胞 15 min 后加入 $5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘氨酸淬灭 15 min,收集细胞内容物并添加目标蛋白抗体下拉蛋白/染色质复合物,后经超声处理、解交联和 DNA 纯化后通过 PCR 鉴定与目标蛋白互作的染色质片段和富集水平。IgG 抗体下拉产物作为阴性对照,未经处理的染色质作为总样本对照(Input),所用引物序列见表 1。

1.10 数据分析

所有数据均采用 Excel 2023 软件进行汇总且以“平均值 $\pm$ 标准误(SEM)”形式表示,结果使用 GraphPad Prism v8.0 软件进行绘图。利用 IBM SPSS v26.0 软件对数据进行统计分析,分别采用 t 检验(针对两个组别)和 one-way ANOVA(针对 3 个及以上组别)进行显著性分析, $P<0.05$ 指代差

异显著(以*或不同小写字母表示), $P<0.01$ 指代差异极显著(以**或不同大写字母表示), $0.05<P<0.1$ 表示具有相应变化趋势。

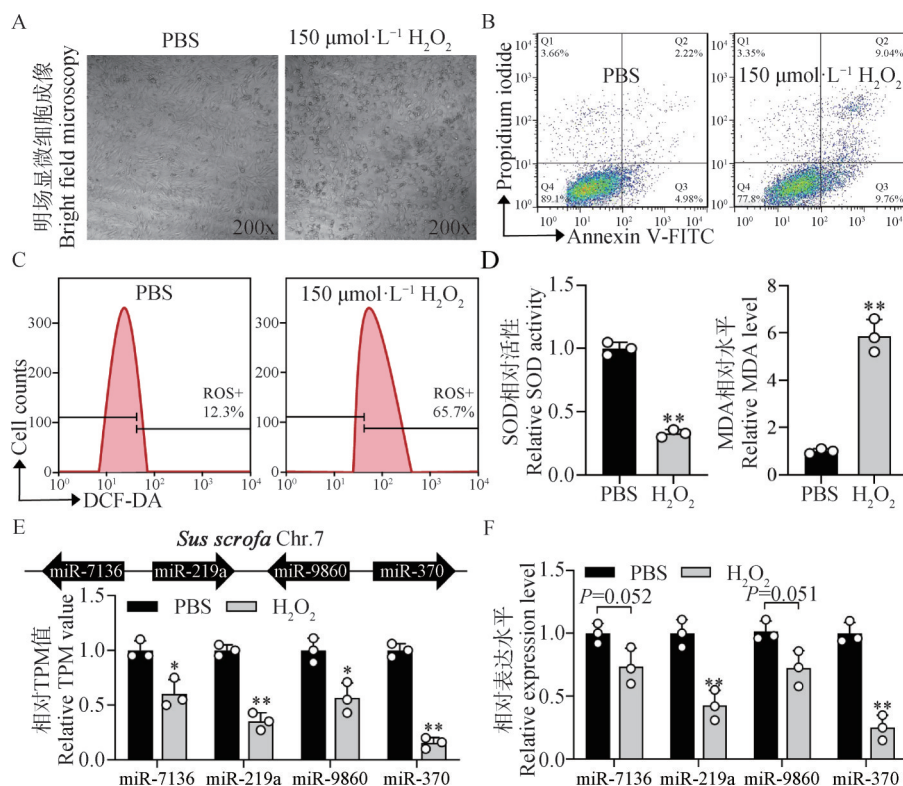
2 结果

2.1 猪卵泡颗粒细胞中 miR-370 和 miR-219a 响应氧化应激表达下调

结合细胞形态学观察、细胞凋亡率检测、ROS 富集分析以及 ELISA 试验等分析结果显示,150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 处理导致体外培养的猪卵泡颗粒细胞形态皱缩且膜完整性受损(图 1A),同时显著促进细胞凋亡($P<0.05$)(图 1B),显著提高细胞内 ROS 累积($P<0.05$)(图 1C),极显著下调 SOD 活性($P<0.01$)且极显著上调 MDA 水平($P<0.01$)(图 1D),以上结果表明猪卵泡颗粒细胞体外氧化应激模型建立成功。基于转录组测序发现,氧化应激显著下调猪 7 号染色体上 4 个 miRNAs(miR-7136、miR-219a、miR-9860 和 miR-370)的表达丰度($P<0.05$)(图 1E)。进一步利用 RT-qPCR 试验验证猪卵泡颗粒细胞中 miR-370 与 miR-219a 响应氧化应激表达极显著下调($P<0.01$),而 miR-7136 与 miR-9860 表现出下调趋势(图 1F),提示 miR-370 与 miR-219a 潜在发挥抗氧化功能。

2.2 miR-370 和 miR-219a 高度保守且在猪卵巢组织中高表达

鉴于目前对 miR-370 和 miR-219a 的基本特征知之甚少,本研究首先查询不同物种二者的前体序列与成熟序列。经比对分析发现,不同物种 miR-370 前体序列的一致性高达 97.33%,成熟序列完全一致;不同物种 miR-219a 前体序列的一致性高达 97.37%,成熟序列的一致性高达 96.36%(图 2A)。染色质定位分析发现,二者在不同物种中具有高度保守的染色体定位和相同的邻近编码基因,其中 miR-370 位于 *RTL1* 和 *DIO3* 基因间,miR-219a 位于 *HSD17B8* 和 *RING1* 基因间(图 2B)。以上结果表明 miR-370 和 miR-219a 在不同物种中进化高度保守。Chen 等^[18]通过高通量测序构建了猪 miRNA 组织表达谱,发现 miR-370 在脾、肾和卵巢组织中高表达,miR-219a 在卵巢组织中特异性高表达(图 2C)。进一步检测 miR-370 和 miR-219a 在试验猪心、肝、脾、肺、肾、脂肪、肌肉和卵巢组织中的表达分布,结果显示,二者的组织表达模式与前期高通量测序结果一致且均在卵巢组织中高表达(图 2D)。



A. 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 处理对颗粒细胞形态的影响; B. 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 处理对颗粒细胞凋亡的影响; C. 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 处理对颗粒细胞内ROS水平的影响; D. 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 处理对颗粒细胞中SOD活性和MDA水平的影响; E. 利用转录组测序分析氧化应激对4个miRNAs表达丰度的影响; F. 通过RT-qPCR鉴定氧化应激对颗粒细胞中4个miRNAs表达水平的影响

A. Effect of 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 on the morphology of sow GCs; B. Effect of 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 on the apoptosis of sow GCs; C. Effect of 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 on the ROS level in sow GCs; D. Effect of 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 on the SOD activity and MDA level in sow GCs; E. Effect of oxidative stress on the abundance of 4 miRNAs in sow GCs was analyzed by RNA-seq; F. Effect of oxidative stress on the expression of 4 miRNAs in sow GCs was detected by RT-qPCR

图1 氧化应激对猪卵泡颗粒细胞中miR-370与miR-219a表达的影响

Fig. 1 Effects of oxidative stress on the expression of miR-370 and miR-219a in sow GCs

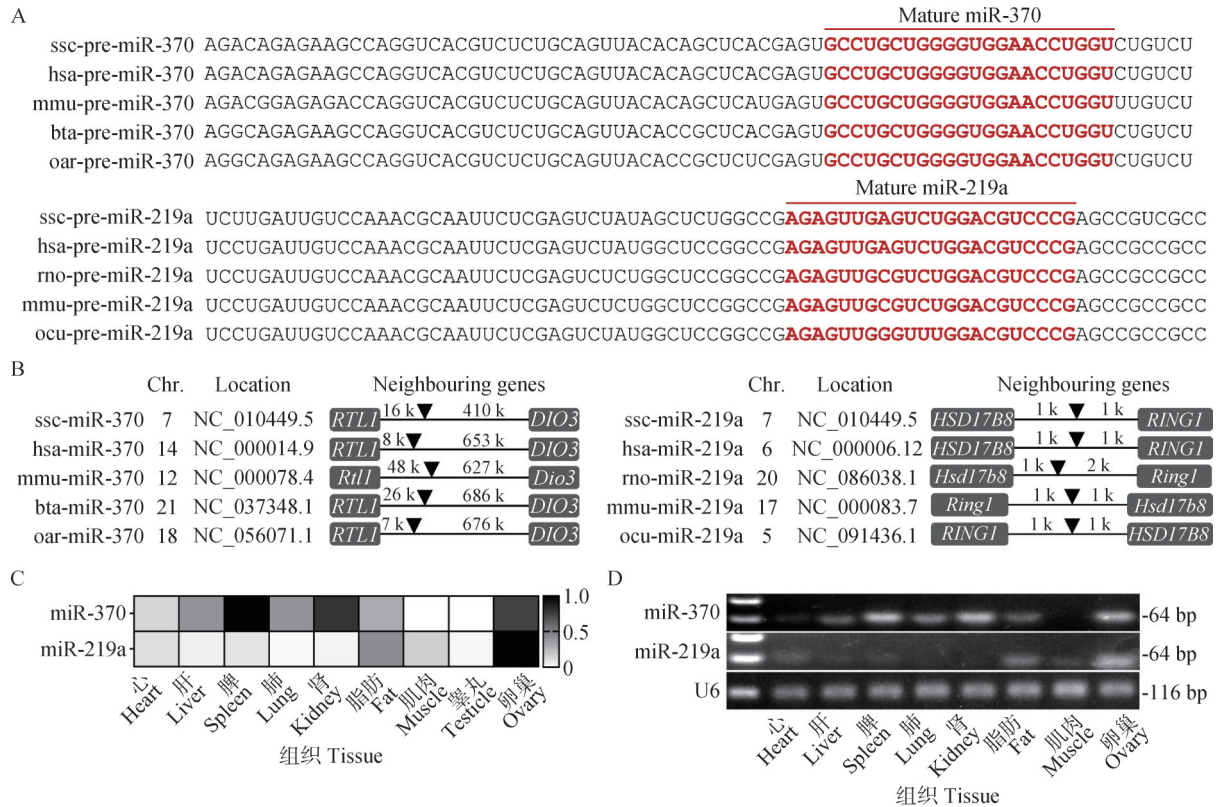
2.3 过表达miR-370和miR-219a抑制猪卵泡颗粒细胞氧化应激损伤

为验证miR-370和miR-219a是否具有抗氧化功能,本研究首先通过相关性分析发现二者的表达水平与猪卵泡颗粒细胞中SOD活性呈极显著正相关($P<0.01$),而与MDA水平呈极显著负相关($P<0.01$)(图3A,B)。随后将miR-370 mimics和miR-219a mimics单独或共同转染进入猪卵泡颗粒细胞体外氧化应激模型,结合ROS水平检测、ELISA试验和细胞凋亡率分析结果显示,过表达miR-370或miR-219a可显著降低 H_2O_2 诱导的ROS累积($P<0.05$)(图3C,D)、极显著上调SOD活性($P<0.01$)且极显著下调MDA水平($P<0.01$)(图3E),同时显著抑制 H_2O_2 诱导细胞凋亡(图3F)。值得注

意的是,同时过表达二者可最大程度挽救 H_2O_2 诱导猪卵泡颗粒细胞氧化应激。以上结果表明,miR-370和miR-219a具有抗氧化功能,过表达二者可显著抑制猪卵泡颗粒细胞氧化应激损伤。

2.4 转录因子KLF5响应氧化应激抑制猪卵泡颗粒细胞中miR-370和miR-219a转录

为解析氧化应激抑制miR-370和miR-219a表达的机制,本研究首先通过RT-qPCR试验发现,二者初体(Pri)和前体(Pre)的表达水平在氧化应激模型中均极显著下调($P<0.01$)(图4A),提示氧化应激对二者的调控发生在转录水平。结合转录组测序数据与生物信息学分析发现转录因子KLF5潜在介导氧化应激对二者转录的调控(图4B),且 H_2O_2 处理可极显著上调KLF5 mRNA和蛋白表达水平



A. 不同物种 miR-370 与 miR-219a 的前体与成熟序列比对; B. 不同物种 miR-370 与 miR-219a 的染色体定位与邻近编码基因; C. 利用高通量测序构建成熟 miR-370 与 miR-219a 的组织表达谱; D. 成熟 miR-370 与 miR-219a 在猪不同组织中的表达分布。U6 作为内参基因

A. Sequence alignment of the pre- and mature miR-370 and miR-219a among species; B. Chromosome location and neighbouring coding genes of miR-370 and miR-219a across species; C. Tissue expression profiles of the mature miR-370 and miR-219a established by high-throughput sequencing; D. The expression levels of mature miR-370 and miR-219a in different sow tissues. U6 is an internal reference gene

图2 miR-370 与 miR-219a 高度保守且在猪卵巢组织中高表达

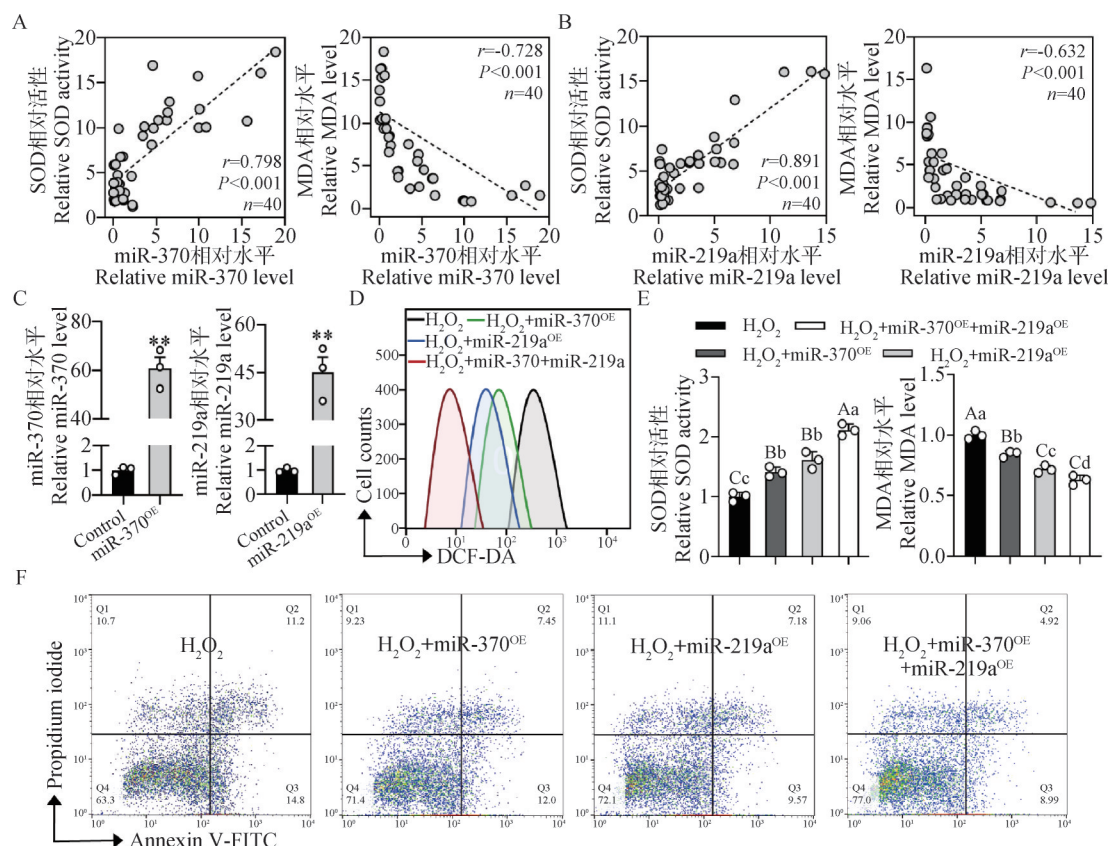
Fig. 2 Conserved miR-370 and miR-219a are highly expressed in sow ovarian tissue

($P < 0.01$) (图 4C, D)。为鉴定 KLF5 对 miR-370 和 miR-219a 转录的调控作用, 研究随后将 KLF5 过表达载体转染进入体外培养的猪卵泡颗粒细胞, 通过 RT-qPCR 试验发现, 过表达 KLF5 极显著抑制二者初体、前体和成熟的表达水平 ($P < 0.01$) (图 4E-G)。为进一步验证 KLF5 是否调控 miR-370 和 miR-219a 的转录活性, 试验分别构建了包含野生型 KLF5 结合位点 (KBS) 的二者启动子区荧光素酶报告载体 (miR-370-WT 和 miR-219a-WT), 并利用定点突变技术分别将 miR-370 启动子 -711~-702 区域和 miR-219a 启动子 -163~-154 区域的 KBS 序列转换为 AAAAAAAAAA (miR-370-MT 和 miR-219a-MT) (图 4H)。分别将上述报告载体与 KLF5 过表达载体共转进入颗粒细胞, 荧光素酶活性检测结果

显示, 过表达 KLF5 极显著抑制野生型载体荧光素酶活性 ($P < 0.01$), 而对 KBS 突变型载体的荧光素酶活性并未产生显著影响 (图 4I)。最后, 通过 ChIP 试验证实 KLF5 可与二者启动子区上 KBS 直接结合, 且氧化应激显著提高 KLF5 在二者启动子上的富集丰度 (图 4J)。综合上述结果表明, KLF5 作为转录抑制因子抑制氧化应激状态下猪卵泡颗粒细胞中 miR-370 和 miR-219a 的转录。

3 讨论

除氧化还原系统外, 氧化应激还受到多种表观因子的调控^[24]。其中, miRNAs 作为一类长度为 18~25 nt 且在体内广泛分布的内源性非编码 RNA 已被证实通过多种途径深度参与哺乳动物不同细



A. 颗粒细胞中 miR-370 表达与 SOD 活性和 MDA 水平的相关性; B. 颗粒细胞中 miR-219a 表达与 SOD 活性和 MDA 水平的相关性; C. miR-370 与 miR-219a 过表达效率 (OE); D. 过表达 miR-370 或 miR-219a 对氧化应激条件下颗粒细胞 ROS 积累水平的影响; E. 过表达 miR-370 或 miR-219a 对氧化应激条件下颗粒细胞 SOD 活性和 MDA 水平的影响; F. 过表达 miR-370 或 miR-219a 对氧化应激条件下颗粒细胞凋亡的影响

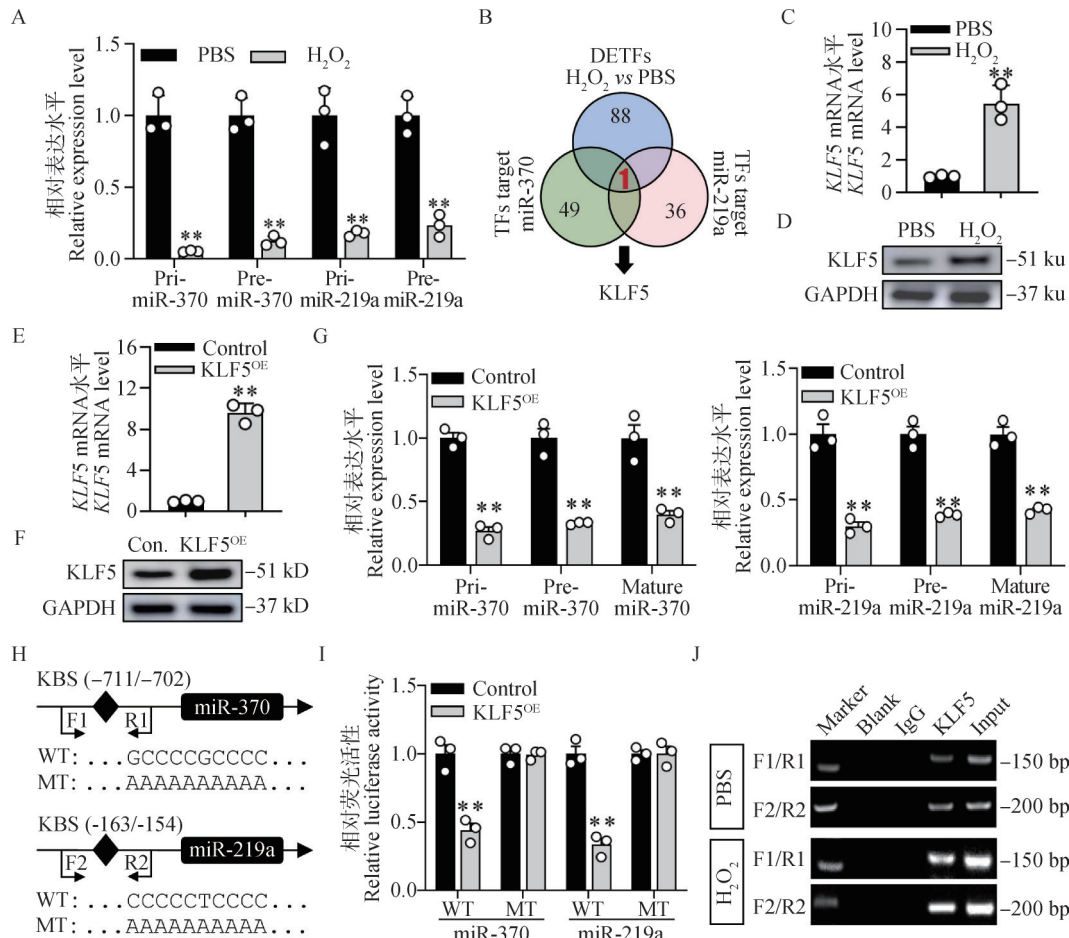
A. Correlation of miR-370 expression with the levels of SOD and MDA in GCs; B. Correlation of miR-219a expression with the levels of SOD and MDA in GCs; C. Overexpression efficiency of miR-370 and miR-219a (OE); D. Effect of overexpression of miR-370 or miR-219a on the ROS accumulation in GCs under oxidative stress; E. Effect of overexpression of miR-370 or miR-219a on the levels of SOD and MDA in GCs under oxidative stress; F. Effect of overexpression of miR-370 or miR-219a on the apoptosis of GCs under oxidative stress

图3 过表达 miR-370 与 miR-219a 抑制猪卵泡颗粒细胞氧化损伤

Fig. 3 Overexpression of miR-370 and miR-219a inhibits the oxidative damage in sow GCs

胞类型的氧化应激过程^[25, 26]。近期研究发现, miRNAs 通过调控氧化应激在雌性哺乳动物卵泡颗粒细胞中发挥关键功能。例如, miR-642a-5p 通过靶向抑制 *FoxO1* 表达引起人和大鼠卵泡颗粒细胞氧化应激损伤、卵巢功能受损, 最终导致早发性卵巢功能不全^[27]; miR-181a 通过靶向抑制 *TGFBR1* 表达引起小鼠卵巢氧化应激损伤并导致颗粒细胞凋亡^[28]; miR-15c-3p 通过靶向抑制 *IGF2BP3* 表达和 AKT-Raf1-ERK1/2 通路活性加剧鸡卵泡颗粒细胞氧化应激并导致其脂质储存和孕酮分泌功能紊乱^[29]。然而, 在猪卵泡颗粒细胞中相关研究较少, 目前仅鉴定了两个具有促进氧化应激功能的

miRNAs, 即 miR-192 和 miR-23a。miR-192 被证实通过靶向抑制 *ACVR2A* 表达诱导猪卵泡颗粒细胞氧化应激损伤^[30]。miR-23a 则作为小激活 RNA 促进 lncRNA *NORHA* 转录间接诱导猪卵泡颗粒细胞凋亡和氧化应激。另外, miR-23a 启动子上 g. -398C>T 突变不仅影响颗粒细胞对氧化应激的应答, 同时还与母猪繁殖性状显著关联^[31]。本研究结合相关性分析和功能验证发现, miR-370 和 miR-219a 能够缓解 H₂O₂ 处理引起的猪卵泡颗粒细胞氧化应激, 同时降低细胞凋亡率, 首次证实二者在猪卵泡颗粒细胞中具有抗氧化功能, 但其功能靶点和作用机制尚不清楚, 仍需进一步研究。



A. 氧化应激对颗粒细胞中 miR-370 和 miR-219a 初体和前体表达水平的影响; B. KLF5 潜在介导氧化应激对 miR-370 和 miR-219a 表达的抑制作用; C, D. 氧化应激对颗粒细胞中 KLF5 表达水平的影响; E, F. *KLF5* 过表达效率检测; G. 过表达 *KLF5* 对颗粒细胞中 miR-370 和 miR-219a 初体、前体和成熟表达水平的影响; H. 荧光素酶报告载体构建示意图; I. 过表达 *KLF5* 对野生型和突变型报告载体荧光素酶活性的影响; J. 利用 ChIP 试验检测不同条件下 KLF5 在 miR-370 和 miR-219a 启动子上的结合丰度

A. Effect of oxidative stress on the expression of pri- and pre- miR-370 and miR-219a in sow GCs; B. KLF5 potentially mediates the inhibitory effect of oxidative stress on the expression of miR-370 and miR-219a; C, D. Effect of oxidative stress on the expression level of KLF5 in sow GCs; E, F. Overexpression efficiency detection of *KLF5*; G. Effect of *KLF5* overexpression on the expression levels of pri-, pre- and mature miR-370 and miR-219a in sow GCs; H. Schematic diagram showing the construction of reporter vectors; I. Effect of *KLF5* overexpression on the luciferase activities of wild-type or mutant-type reporter vectors; J. Binding abundance of KLF5 on the promoters of miR-370 and miR-219a under different conditions was detected by ChIP

图 4 *KLF5* 作为转录抑制因子抑制猪卵泡颗粒细胞中 miR-370 与 miR-219a 转录

Fig. 4 *KLF5* inhibits the transcription of miR-370 and miR-219a in sow GCs by acting as a transcriptional repressor

本研究结合序列比对和染色质定位分析发现, miR-370 和 miR-219a 在不同物种间进化高度保守且具有相同的染色质定位,这与前人发现 miRNAs 具有高度进化保守性特征一致,同时提示二者功能具有潜在的种间相似性。现阶段研究表明二者主要参与成骨分化、血管形成、神经发育、免疫应答、多种疾病以及癌症发生^[32-35],且功能途径主要依赖 miRNAs 的经典作用机制,即通过碱基互补配对原

则直接结合靶 mRNA 3'-UTR 并抑制后者稳定性或翻译过程。尽管通过公开高通量数据和本研究组织表达谱分析发现二者在卵巢组织中高表达,但其在雌性哺乳动物卵巢组织中的功能却鲜有研究,仅有 Zhou 等^[36]指出 miR-370 通过靶向抑制 *GLI1* 表达抑制小鼠卵泡颗粒细胞凋亡并促进雌二醇合成。有趣的是,除本研究在猪卵巢组织中的发现外,二者的抗氧化功能在其他物种部分细胞类型中也被

证实。例如,miR-370通过靶向抑制 *BACH1* 表达缓解线粒体功能异常引起的大脑皮层细胞氧化应激损伤,进而维持突触的正常功能^[37];miR-370通过靶向抑制 *TLR4* 表达抑制氧化型低密度脂蛋白引起的巨噬细胞氧化应激和炎症反应^[38];miR-219a通过阻碍 p66shc 介导 ROS 产生抑制肝细胞氧化应激并缓解酒精肝损伤^[39]。综合上述研究发现表明二者的抗氧化功能具有潜在普遍性。

与编码基因和其它非编码基因相同,miRNAs 的转录也受到转录因子调控^[40]。本研究证实在猪卵泡颗粒细胞中,转录因子 KLF5 通过直接靶向结合 miR-370 和 miR-219a 启动子抑制二者转录。KLF5 属于 Krüppel-like 锌指转录因子家族成员,该家族共包含 18 个转录因子,可通过特异性识别并结合启动子 GC 富集元件调控靶基因转录^[41]。前人研究表明,KLF5 在不同病理过程中调控 miR-29a、miR-155 和 miR-200 等多个 miRNAs 转录^[42-43]。本研究在猪卵巢组织的生理过程中建立了 KLF5 与 miRNAs 的直接联系,但该调控模式在猪卵巢组织中,尤其是在氧化应激条件下是否具有普遍性尚未明确。另外,本研究还发现氧化应激促进猪卵泡颗粒细胞中 KLF5 表达并提高其转录因子活性,这与近期在人、猪和小鼠心肌细胞氧化应激研究中的发现一致^[44-45],暗示 FoxO1 等应激效应因子潜在介导氧化应激对 KLF5 表达和活性的促进作用。有趣的是, Li 和 Yang 等^[46-47] 分别在骨髓间充质干细胞和鳞状上皮细胞中发现 KLF5 响应氧化应激表达下调,而上述过程主要依赖 DNA 甲基化、蛋白乙酰化和泛素化降解等表观调控途径。以上结果表明,氧化应激对 KLF5 表达的调控存在双向性,其最终结果可能由不同调控物或调控模式决定。

4 结 论

本研究明确了氧化应激对猪卵泡颗粒细胞中 miR-370 和 miR-219a 转录的抑制作用,证实该过程由响应氧化应激的转录抑制因子 KLF5 介导完成。此外,发现 miR-370 和 miR-219a 具有抗氧化能力,能有效缓解猪卵泡颗粒细胞氧化应激损伤。研究结果为利用内源性小分子调节物抑制氧化应激、促进卵泡发育以及改善母猪繁殖力提供了理论依据和实践靶点。

参考文献(Reference):

- [1] JO M, BRANNSTROM M, AKINS J W, et al. New insights into the ovulatory process in the human ovary [J]. *Hum Reprod Update*, 2025, 31(1): 21-47.
- [2] LIU M, CHEN J, LIU S, et al. LH-stimulated periodic lincRNA HEOE regulates follicular dynamics and influences estrous cycle and fertility via miR-16-ZMAT3 and PGF2alpha in pigs [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 281(Pt 3): 136426.
- [3] KNOX R V. PHYSIOLOGY AND ENDOCRINOLOGY SYMPOSIUM: Factors influencing follicle development in gilts and sows and management strategies used to regulate growth for control of estrus and ovulation1 [J]. *J Anim Sci*, 2019, 97(4): 1433-1445.
- [4] COSTERMANS N G J, TEERDS K J, KEIJER J, et al. Follicular development of sows at weaning in relation to estimated breeding value for within-litter variation in piglet birth weight [J]. *Animal*, 2019, 13(3): 554-563.
- [5] WANG M, SHENG W, ZHANG J, et al. A mutation losing an RBP-binding site in the lncRNA NORSF transcript influences granulosa cell apoptosis and sow fertility [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2024, 11(40): e2404747.
- [6] DU X, LIU L, LI Q, et al. NORFA, long intergenic noncoding RNA, maintains sow fertility by inhibiting granulosa cell death [J]. *Commun Biol*, 2020, 3(1): 131.
- [7] 赵顺然, 付桂鑫, 庞钊琪, 等. 猪颗粒细胞在卵泡闭锁中的作用机制研究进展 [J]. *畜牧兽医学报*, 2025, 56(6): 2537-2545.
ZHAO S R, FU G X, PANG Z Q, et al. Research progress on the mechanism of porcine granulosa cells in follicular atresia [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2025, 56(6): 2537-2545. (in Chinese)
- [8] NI Z, LI Y, SONG D, et al. Iron-overloaded follicular fluid increases the risk of endometriosis-related infertility by triggering granulosa cell ferroptosis and oocyte dysmaturity [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(7): 579.
- [9] CHEN M, HE C, ZHU K, et al. Resveratrol ameliorates polycystic ovary syndrome via transzonal projections within oocyte-granulosa cell communication [J]. *Theranostics*, 2022, 12(2): 782-795.
- [10] SUNAK N, GREEN D F, ABEYDEERA L R, et al. Implication of cortisol and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase enzymes in the development of porcine (*Sus scrofa domestica*) ovarian follicles and cysts [J].

- Reproduction*, 2007, 133(6):1149-1158.
- [11] SIES H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine[J]. *Redox Biol*, 2015, 4:180-183.
- [12] LAURIDSEN C. From oxidative stress to inflammation: redox balance and immune system[J]. *Poult Sci*, 2019, 98(10):4240-4246.
- [13] YAN L. Positive oxidative stress in aging and aging-related disease tolerance [J]. *Redox Biol*, 2014, 2:165-169.
- [14] 陈 翠, 龚 蕾, 徐 哲, 等. AMPK对过氧化氢诱导细胞衰老的阻遏研究[J]. 中国畜牧兽医, 2023, 50(6):2255-2264.
- CHEN C, GONG L, XU Z, et al. Study on the inhibition of hydrogen peroxide-induced cellular aging by AMPK[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2023, 50(6):2255-2264. (in Chinese)
- [15] MATYAS C, HASKO G, LIAUDET L, et al. Interplay of cardiovascular mediators, oxidative stress and inflammation in liver disease and its complications [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2021, 18(2):117-135.
- [16] HUANG Y, CHENG Y, ZHANG M, et al. Oxidative stress and inflammatory markers in ovarian follicular fluid of women with diminished ovarian reserve during *in vitro* fertilization[J]. *J Ovarian Res*, 2023, 16(1):206.
- [17] 李 媛, 张依莎, 游 典, 等. 氧化应激在卵巢功能障碍中的作用机制研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(12):1606-1615.
- LI Y, ZHANG Y S, YOU D, et al. Research on mechanisms of oxidative stress in ovarian dysfunction [J]. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, 2024, 32(12):1606-1615. (in Chinese)
- [18] CHEN Y, YANG J, ZHANG L. The impact of follicular fluid oxidative stress levels on the outcomes of assisted reproductive therapy [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2023, 12(12):2117.
- [19] WANG L, TANG J, WANG L, et al. Oxidative stress in oocyte aging and female reproduction [J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(12):7966-7983.
- [20] DU X, LI Q, CAO Q, et al. Integrated analysis of miRNA-mRNA interaction network in porcine granulosa cells undergoing oxidative stress [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019:1041583.
- [21] CHEN M, YAO Y L, YANG Y, et al. Comprehensive profiles of mRNAs and miRNAs reveal molecular characteristics of multiple organ physiologies and development in pigs[J]. *Front Genet*, 2019, 10:756.
- [22] 霍洪安, 李小雪, 孙 彬, 等. 猪卵泡发育过程中颗粒细胞内参基因表达稳定性分析[J]. 南京农业大学学报, 2024, 47(4):710-720.
- HUO Y A, LI X X, SUN C, et al. Stability analysis of reference gene expression in granulosa cells during porcine follicular development[J]. *Journal of Nanjing Agriculture University*, 2024, 47(4):710-720. (in Chinese)
- [23] GUO Z, ZENG Q, LI Q, et al. LncRNA NORFA promotes the synthesis of estradiol and inhibits the apoptosis of sow ovarian granulosa cells through SF-1/CYP11A1 axis[J]. *Biol Direct*, 2024, 19(1):107.
- [24] LIU Z, SONG K, TU B, et al. Crosstalk between oxidative stress and epigenetic marks: New roles and therapeutic implications in cardiac fibrosis [J]. *Redox Biol*, 2023, 65:102820.
- [25] LAN J, HUANG Z, HAN J, et al. Redox regulation of microRNAs in cancer [J]. *Cancer Lett*, 2018, 418:250-259.
- [26] DUTTA S, SENGUPTA P, MOTTOLA F, et al. Crosstalk between oxidative stress and epigenetics: Unveiling new biomarkers in human infertility [J]. *Cells*, 2024, 13(22):1846.
- [27] ZHU X, LI W, LU M, et al. M(6)A demethylase FTO-stabilized exosomal circBRCA1 alleviates oxidative stress-induced granulosa cell damage via the miR-642a-5p/FOXO1 axis [J]. *J Nanobiotechnol*, 2024, 22(1):367.
- [28] 卢清侠, 王献伟, 马 强, 等. 原花青素下调 miR-181a 抑制颗粒细胞氧化损伤的作用机制[J]. 畜牧与兽医, 2023, 55(10):29-36.
- LU Q X, WANG X W, MA Q, et al. Grape seed procyanidins protect granulosa cells from oxidative stress-induced injury by down-regulating miR-181a expression [J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2023, 55(10):29-36. (in Chinese)
- [29] LIN Z, GONG Y, YU C, et al. IGF2BP3 curbed by miR-15c-3p restores disrupted lipid storage and progesterone secretion in chicken granulosa cells under oxidative stress through AKT-Raf1-ERK1/2 signaling pathway[J]. *Poult Sci*, 2025, 104(2):104761.
- [30] ZHANG J, REN Q, CHEN J, et al. Downregulation of miR-192 alleviates oxidative stress-induced porcine granulosa cell injury by directly targeting Acvr2a[J]. *Cells*, 2022, 11(15):2362.
- [31] WANG S, LI Y, ZENG Q, et al. A mutation in endogenous saRNA miR-23a influences granulosa cells response to oxidative stress [J]. *Antioxidants*

- (*Basel*), 2022, 11(6):1174.
- [32] YU L, XIA K, ZHOU J, et al. circ_0003204 regulates the osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells via miR-370-3p/HDAC4 axis[J]. *Int J Oral Sci*, 2022, 14(1):30.
- [33] GU Y, BECKER V, ZHAO Y, et al. miR-370 inhibits the angiogenic activity of endothelial cells by targeting smoothened (SMO) and bone morphogenetic protein (BMP)-2[J]. *FASEB J*, 2019, 33(6):7213-7224.
- [34] SHI Y, DAI S, QIU C, et al. MicroRNA-219a-5p suppresses intestinal inflammation through inhibiting Th1/Th17-mediated immune responses in inflammatory bowel disease [J]. *Mucosal Immunol*, 2020, 13(2):303-312.
- [35] MA S, MA F, DING N, et al. Homocysteine promotes the pathogenesis of atherosclerosis through the circ-PIAS1-5/miR-219a-2-3p/TEAD1 axis [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2025, 12(18):e2415563.
- [36] ZHOU X, HE Y, PAN X, et al. DNMT1-mediated lncRNA IFFD controls the follicular development via targeting GLI1 by sponging miR-370 [J]. *Cell Death Differ*, 2023, 30(2):576-588.
- [37] DU M, WU C, YU R, et al. A novel circular RNA, circIgfbp2, links neural plasticity and anxiety through targeting mitochondrial dysfunction and oxidative stress-induced synapse dysfunction after traumatic brain injury [J]. *Mol Psychiatry*, 2022, 27(11):4575-4589.
- [38] TIAN D, SHA Y, LU J, et al. MiR-370 inhibits vascular inflammation and oxidative stress triggered by oxidized low-density lipoprotein through targeting TLR4[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(7):6231-6237.
- [39] FU R, ZHOU J, WANG R, et al. Protocatechuic acid-mediated miR-219a-5p activation inhibits the p66shc oxidant pathway to alleviate alcoholic liver injury [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019:3527809.
- [40] SHANG R, LEE S, SENAVIRATHNE G, et al. microRNAs in action: biogenesis, function and regulation[J]. *Nat Rev Genet*, 2023, 24(12):816-833.
- [41] PESTAL K, SLAYDEN L C, BARTON G M. KLF family members control expression of genes required for tissue macrophage identities [J]. *J Exp Med*, 2025, 222(5):e20240379.
- [42] ZHENG B, YIN W, SUZUKI T, et al. Exosome-mediated miR-155 transfer from smooth muscle cells to endothelial cells induces endothelial injury and promotes atherosclerosis [J]. *Mol Ther*, 2017, 25(6):1279-1294.
- [43] ZHENG B, ZHENG C, ZHANG Y, et al. Regulatory crosstalk between KLF5, miR-29a and Fbw7/CDC4 cooperatively promotes atherosclerotic development [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864(2):374-386.
- [44] MYLONAS N, SIOKATAS G, ZACHARIA E, et al. Cardiac ischemia/reperfusion increases cardiomyocyte KLF5 in pigs and mice that aggravates tissue injury and remodeling [J]. *Cardiovasc Res*, 2025, 121(6):900-914.
- [45] KYRIAZIS I D, HOFFMAN M, GAIGNEBET L, et al. KLF5 is induced by FOXO1 and causes oxidative stress and diabetic cardiomyopathy [J]. *Circ Res*, 2021, 128(3):335-357.
- [46] LI L, WANG H, CHEN X, et al. Oxidative stress-induced hypermethylation of KLF5 promoter mediated by DNMT3B impairs osteogenesis by diminishing the interaction with beta-catenin [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2021, 35(1):1-20.
- [47] YANG Y, BHARGAVA D, CHEN X, et al. KLF5 and p53 comprise an incoherent feed-forward loop directing cell-fate decisions following stress [J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(5):299.

(编辑 郭云雁)