

卵巢早衰颗粒细胞凋亡调控机制的研究进展

杨 阳 陶仕英 赵丕文 卢 迪 杨 蕾 饶晨晨

摘 要 卵巢早衰是妇科疾病中常见病之一,近年来其发生率呈逐年增加的趋势,且低龄化趋向愈益明显。卵巢早衰发生的主要机制是卵泡细胞闭锁进程的加速,而其进程加速主要是由于颗粒细胞的凋亡,所以颗粒细胞在评判卵母细胞是否健康,胚胎生长状态是否良好这两方面起到了举足轻重的作用。因此对于总结研究近年来颗粒细胞凋亡调控机制相关文献十分必要。本文总结归纳了相关文献,根据具体机制的不同,分为3个角度,调控颗粒细胞凋亡的相关基因,介入颗粒细胞凋亡过程的细胞因子和调节颗粒细胞的相关激素,从这几方面进行了综述。

关键词 卵巢早衰 颗粒细胞 细胞凋亡 凋亡基因 类固醇激素 细胞因子

中图分类号 R329.2

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.01.005

卵巢早衰(premature ovarian failure, POF)是指妇女发生在40岁以前的由于卵巢功能衰竭所致的4个月以上的闭经^[1]。特点是原发性或继发性闭经伴随血促性腺激素(gonadotropins)水平的升高和雌激素(estrogen)水平的降低,并伴有一系列不同程度的抑郁、焦虑、敌对、悲伤、无奈、性生活不满意等表现^[2]。近年来,随着经济的发展,女性社会地位不断发生变化,压力的不断增加,卵巢早衰越来越影响到妇女的身心健康和生殖健康。有研究从遗传,免疫,感染,医源性等方面对卵巢早衰进行了相关研究,结果显示以上这些因素都与颗粒细胞的凋亡有密切关系^[3-5]。

颗粒细胞(granulosa cell, GC)位于卵母细胞透明带外侧,一般有多层,与卵母细胞相连,不仅对于卵母细胞的成熟有重要影响,而且对于整个卵巢的功能也作用极大。颗粒细胞和卵母细胞关系密切体现在:颗粒细胞的增殖、分化由卵母细胞指导,反过来颗粒细胞又会为卵母细胞的成熟提供重要的营养和信号,所以颗粒细胞的状态会对卵母细胞的质量还有胚胎发育潜能有很大影响^[6,7]。在一定条件下,它们可以直接或间接地引起卵泡闭锁加快,从而导致卵巢早衰。下面本文总结了近年来国内外相关文献,从调控颗粒细胞凋亡的相关基因,介入颗粒细胞凋亡进程的细胞因子和调节颗粒细胞的相关激素这几个方面进行综述。

一、调控颗粒细胞凋亡的相关基因

调控颗粒细胞凋亡的相关基因可分为抗凋亡基

因(anti-apoptosis gene)和促凋亡基因(pro-apoptosis gene)两类。抗凋亡基因包括线虫体内发现的ced-9、B细胞淋巴瘤/白血病-2(B-cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)基因、原癌基因ras和病毒基因E1A、E1B等。促凋亡基因包括ced-3和ced-4,以底物特异性半胱氨酸蛋白酶为产物的caspase家族,原癌基因c-myc和p53等。

1. Bcl-2/Bax基因:Bax基因是Bcl-2基因家族中的一员,Bcl-2蛋白具有促进细胞生存,抗细胞凋亡的作用,而Bax蛋白作用却与此相反,能够加速诱导颗粒细胞的凋亡。研究显示细胞凋亡机制是被Bcl-2家族成员严密调控的,其中编码的Bax蛋白可与Bcl-2形成异二聚体,二者通常以此种形式发挥作用。值得一提的是,Bcl-2/Bax的比值可以比较准确地揭示细胞接下来是健康生长或是凋亡^[8,9]。除此之外Bcl-2和Bax还可以形成Bcl-2/Bax异二聚体。在同二聚体增加的情况下,细胞中线粒体的通透性会增加,细胞凋亡进程加快。反之如果Bcl-2蛋白含量高,则Bcl-2/Bax异二聚体增多,能够抑制细胞凋亡。Miramar等^[10]研究指出,Bcl-2/Bax基因影响细胞的凋亡机制可能是Bcl-2首先接受细胞内的死亡信号,激活后与同家族成员Bax, Bak等作用,导致线粒体膜通透性发生改变,继而引发跨膜电位减弱甚至丢失促使细胞色素C和其他蛋白释放。细胞色素C与凋亡蛋白活化因子(apaf-1)结合为多聚复合体,募集caspase-9的前体,启动caspase级联反应,从而激活下游的caspase-3和caspase-7,最终引发细胞凋亡反应。

2. p53基因:p53在细胞正常分裂过程中起着重

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81273887,81673764)

作者单位:100029 北京中医药大学

通讯作者:陶仕英,电子信箱:taoshiying1970@163.com

要的调节作用,具体表现为可明显抑制细胞的转化生长,是一种典型的促进细胞凋亡的基因,并且许多凋亡因子也依赖于 p53 的激活来调节细胞凋亡。p53 能够通过激活位于血浆膜的死亡受体,包括 Fas、DR4、DR5 等,从而促进细胞凋亡^[11]。此外, Liang 等^[12]研究指出, p53 促进颗粒细胞凋亡的机制可能是: p53 抑制颗粒细胞内由 TGF- β 1 诱导的有关 miRNA 的表达,继而通过 miRNA 影响卵巢颗粒细胞的生长、发展和凋亡的过程。

3. Fas-FasL 基因: Fas 基因的表达产物 Fas 蛋白是肿瘤坏死因子受体家族的细胞表面分子之一。Fas 配体(Fas ligand, Fas-L) 是 1 种细胞表面分子,属于肿瘤坏死因子家族。Fas 是细胞表面重要的死亡受体,与其配体 Fas-L 结合后活化并诱导凋亡信号,从而诱导表达 Fas 的靶细胞凋亡^[13]。Yang 等^[14]发现 FasL 能显著抑制牛卵泡颗粒细胞增殖,具体机制尚未清楚。Lin 等^[15]检测颗粒细胞 Fas-FasL mRNA 的表达,发现 Fas、Fas-L mRNA 的表达随细胞培养时间的延长而增高,由此可推测 Fas/Fas-L 通路的激活有可能是引发颗粒细胞凋亡的重要因素之一。

4. caspase 基因: 细胞凋亡发生的关键是 caspase 家族蛋白酶,其中 caspase-3 是最重要的细胞凋亡效应蛋白,能够参与多种途径诱导细胞凋亡^[16]。相关研究表明, caspase 基因的凋亡途径很可能是颗粒细胞凋亡的主要机制之一^[17,18]。凋亡激活的途径取决于起始激活的 caspase 类型,可分为 3 种,分别是死亡受体途径或外源性途径,线粒体途径或内源性途径和内质网途径,其中死亡受体途径是通过死亡受体和相关死亡结构域蛋白 FADD 结合后,激活 caspase-8 和 caspase-10;线粒体途径是细胞色素 C 和凋亡蛋白酶活化因子-1 (Apaf-1) 结合形成多聚体后,再与 caspase-9 形成凋亡小体,从而激活下游级联反应;内质网途径是内质网应激导致钙离子稳态失衡从而激活 caspase-12,再进一步激活 caspase-9。这 3 种途径激活时效应区或相关因子与 caspase 酶原结合,结合后 caspase 酶原便转化为有活性的 caspase,继而通过其活性激活下游的 caspase-3、6、7 等,引起一系列的等级连锁反应,从而诱导细胞的凋亡。

5. Myc 基因: Myc 是一组比较早发现的癌基因,目前发现有 C-myc、N-myc 和 L-myc 3 种。Myc 属于核蛋白类基因,不仅可调节细胞的增殖和凋亡,还对细胞的周期和分化有影响。有相关研究表明,随着卵泡的逐渐发育和功能不断完善, Myc 基因的表达

也会有相应变化,例如,最初的原始卵泡阶段, Myc 呈强阳性,这种强阳性会随着卵泡的不断发育逐渐减弱,直到最终卵泡闭锁时,只有卵泡膜细胞可检测到 Myc 蛋白,所以 Myc 蛋白可能具有促进颗粒细胞凋亡的作用,进而诱导卵泡膜细胞的凋亡^[19,20]。Akiyama 等^[21]通过实验证明上调组蛋白去乙酰化酶抑制剂(Saha) 可以刺激 Bim,随后导致细胞色素 C 的释放,继而发生细胞凋亡。

二、调节颗粒细胞的相关激素

激素可以调节体内各种组织细胞的代谢活动,影响机体的代谢、生长、发育等活动。在卵泡逐渐闭锁的过程中,激素可以作为重要影响因素参与颗粒细胞的凋亡过程。主要可分为以下几类:类固醇激素,促性腺激素,促性腺激素释放素,活化素和抑制素等,而下丘脑-垂体-腺体轴可以有效调控这些激素在体内的作用,这些激素一旦出现内部异常或者传导异常,都有可能造成颗粒细胞凋亡。

1. 类固醇激素:类固醇激素又叫做甾体激素,最主要 3 种分别为雄激素,雌激素和孕激素。Peluso 等研究指出,这 3 种类固醇激素都和颗粒细胞凋亡有一定相关性,其中雄激素能够直接促使卵泡生长,抑制颗粒细胞凋亡。雌激素可抑制窦前卵泡和早期窦状卵泡的凋亡。而孕激素则是通过 G 蛋白酶相关通路来达到调节颗粒细胞凋亡的作用。Garcia-Rudaz 等认为,在颗粒细胞内,相关雌激素与其相应受体结合,结合后受体结构出现一些变化可与相关基因再结合,最终通过调控这些基因来达到调节颗粒细胞的目的,可以称为基因组机制,但具体机制待研究。

2. 促性腺激素:促性腺激素(gonadotropins) 是一种糖蛋白激素,主要包括两种激素:促卵泡刺激素(FSH) 和促黄体生成素(LH),其功能是促进性激素的生成和分泌。杨四华等研究指出,在卵巢中, FSH 受体和 LH 受体与颗粒细胞的状态有相关性,卵泡闭锁和颗粒细胞凋亡会导致 FSH 和 LH 受体表达降低。反之利用 FSH 或 eCG、hCG、LH 干预卵泡和颗粒细胞时,可抑制卵泡闭锁。Tsai-Turton 等研究表明, FSH 可减缓颗粒细胞的凋亡速度,相关机制可能是 FSH 作用于间隙连接蛋白 CX43,使其生成量增加,抗凋亡信号因此加强,最终减缓颗粒细胞的凋亡速度。

3. 促性腺释放激素:促性腺释放激素(gonadotropin releasing hormone, GnRH) 是主要由下丘脑合成并分泌的一种多肽类生殖激素,它通过与颗粒细胞膜上的特异性受体结合,诱导颗粒细胞凋亡。Cheng

等^[22]研究认为 GnRH 导致卵巢颗粒细胞减少可能是因其对细胞增殖的直接抑制,作者通过 Western blot 观察了人卵巢颗粒细胞中 caspase - 3 的表达,结果显示 GnRH 显著提高了 caspase - 3 的表达,具体机制可能是卵巢中过度表达的 FOXL2 基因会导致促性腺释放激素受体 GnRHR 表达的增加,进而引起颗粒细胞凋亡的增加。

4. 激活素和抑制素:激活素和抑制素都是转化生长因子 TGF - β 超家族的成员,生物学作用广泛,可调节细胞的生长,分化等。激活素可以激活 FSH 的表达,相反抑制素可以强烈抑制 FSH 的表达,而 FSH 可减缓颗粒细胞的凋亡速度,所以激活素影响颗粒细胞凋亡的机制可能是通过 FSH 来实现的,表现为激活素能够抑制颗粒细胞凋亡,抑制素能够诱导颗粒细胞的凋亡。除此之外,近年来 Cheng 等^[23]采用基因沉默的方法进行探究,指出 Smad2、Smad3 或 ERK1/2 的抑制性表达会减弱 TGF - β 1 在生长因子的表达,进而对卵巢颗粒细胞的凋亡产生相关作用,这些研究为探讨相关激素方面影响颗粒细胞凋亡新的信号通路提供了新的数据支持。

三、介入颗粒细胞凋亡过程的细胞因子

细胞因子是由免疫细胞和一部分非免疫细胞分泌的一类极具生物学活性的低分子蛋白质。在人体体内可以结合相应的受体来调节细胞的生长分化。随着对颗粒细胞凋亡和细胞因子之间相互作用关系的不断研究,发现不同类型细胞因子对颗粒细胞的凋亡的确有不同作用,主要分为抑制颗粒细胞凋亡的细胞因子和诱导颗粒细胞的细胞因子。前者主要包括:类胰岛素样生长因子,成纤维细胞生长因子等;后者主要包括:转化生长因子、纤溶酶原生长因子、表皮生长因子、肿瘤坏死因子、白细胞介素等。

1. 类胰岛素样生长因子:类胰岛素样生长因子 (insulin - like growth factor, IGF), 因与胰岛素的结构相类似而得名,是一类低分子量的单链肽类激素,主要在肝脏合成。马小红等^[24]研究发现,人类的卵泡膜细胞和颗粒细胞都能够合成 IGF 蛋白,并且通过作用将 IGF 蛋白释放于卵泡液。研究中尤其发现 IGF - 1 在颗粒细胞中有较明显的表现,与其受体结合后能够刺激颗粒细胞的增殖并促进卵泡的进一步发育。

2. 表皮生长因子:表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 是由 53 个氨基酸残基组成的单链多肽,对卵巢颗粒细胞的增殖及卵母细胞的成熟具有

很强的诱导作用。相关研究已经证实 EGF 可以使孕酮产生增多,同时对细胞内钙离子也有调节作用,者两方面的作用会使大鼠的颗粒细胞凋亡受到抑制。除此之外,马会明等^[25]研究得出,丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (Akt) 在 EGF 刺激细胞后早期即参加了 PI_3K/Akt 信号通路的调节,而且在 EGF 的持续刺激下表现出磷酸化水平的提高,对颗粒细胞的凋亡调控有一定作用。

3. 凋亡蛋白酶激活因子:凋亡蛋白酶激活因子 (apoptosis protease activating factor, Apaf) 是一种相对分子质量为 130000 的可溶性蛋白质,分为 Apaf - 1 和 Apaf - 2 两种。Hu 等研究指出, caspase - 9 可以被 Apaf - 1 介导引发颗粒细胞的凋亡。具体机制可能是 Apaf - 1 和 caspase - 9 结合形成凋亡体, caspase - 9 被激活,继而激活下游的凋亡执行分子 caspase - 3、caspase - 6、caspase - 7 等,最终导致 DNA 断裂,引发颗粒细胞凋亡。

四、展 望

总之,调控颗粒细胞凋亡的相关基因,介入颗粒细胞凋亡进程的细胞因子和调节颗粒细胞的相关激素这 3 方面通过各自不同的作用方式,都对卵巢早衰中颗粒细胞的凋亡有诱导或抑制作用。

相关研究表明,某些基因能够达到其对颗粒细胞凋亡的调控作用是通过 3 条途径实现的:线粒体途径,死亡受体途径和内质网途径。首先,线粒体途径中有多重蛋白参与, p53 为途径首端,之后 Bcl - 2 和 Bax 也参与到此途径中,而且 Bcl - 2 可抑制 Bax 的作用。第 2 条途径为死亡受体途径,主要参与因子为 TNF - α , 最终线粒体途径和死亡受体途径都可以通过激活 caspase - 3 来诱导细胞凋亡。而第 3 条途径为内质网途径,是三者中最新确定的凋亡途径,作为重要的亚细胞室引发颗粒细胞的凋亡,主要机制是内质网应激 (蛋白质错误折叠或未折叠、内质网胁迫) 导致细胞内钙超载或者钙离子稳态失衡,一方面激活 caspase - 12, caspase - 12 进一步激活 caspase - 9 而促进凋亡发生,另一方面诱导 Bcl - 2 家族中促凋亡蛋白 bax 和 bak 的激活诱导凋亡。介入颗粒细胞凋亡进程的细胞因子在分子生物学微观角度例如蛋白质水平和基因水平上对凋亡的过程进行调控,除此之外还和细胞水平的增殖和凋亡等环节,与颗粒细胞凋亡相关疾病的发生,转归也有密切关系。最后影响颗粒细胞凋亡调控机制的生殖激素主要作用途径是:下丘脑 - 垂体 - 性腺轴,生殖激素可以通过此途径较为

精准地调控颗粒细胞的凋亡过程,但具体机制有待进一步研究。

近年来,表观遗传学不断突破新的领域,其调控机制对于人类的健康有广泛而又深刻的意义。有研究者指出,对于颗粒细胞凋亡的表观遗传学正处于起步阶段,相关机制有可能是通过与其他激素质量浓度、物质代谢和基因表达等环节联系,从而进一步探究颗粒细胞凋亡的具体机制。对于颗粒细胞凋亡相关表观遗传学的进一步探索,将会为卵巢早衰等疾病带来新的药物设计模式或治疗策略。

参考文献

- 1 Ebrahimi M, Akbari Asbagh F. Pathogenesis and causes of premature ovarian failure: An update[J]. Int J Fertil Steril, 2011, 5(2): 54 - 65
- 2 Van der Stege JG, Groen H, Van Zadelhoff SJ, *et al.* Decreased androgen concentrations and diminished general and sexual well - being in women with premature ovarian failure[J]. Menopause, 2008, 15(1): 23 - 31
- 3 Rossetti F, Rizzolio F, Pramparo T, *et al.* A susceptibility gene for premature ovarian failure (POF) maps to proximal Xq28 [J]. Eur J Hum Genet, 2004, 12(10): 829 - 834
- 4 Mahbod Ebrahimi MD, Firouzeh Akbari Asbagh MD. The role of autoimmunity in premature ovarian failure[J]. Iran J Reprod Med, 2015, 13(8): 461 - 472
- 5 Massin N, Meduri G, Bachelot A, *et al.* Evaluation of different markers of the ovarian reserve in patients presenting with premature ovarian failure[J]. Mol Cell Endocr, 2008, 282(1 - 2): 95 - 100
- 6 刘鹏,李向臣,姚雅馨,等. 卵巢颗粒细胞凋亡的调控因素[J]. 现代生物医学进展, 2009, 9(13): 2562 - 2564
- 7 Liu S, Jiang L, Zhong T, *et al.* Effect of acrylamide on oocyte nuclear maturation and cumulus cells apoptosis in mouse in vitro[J]. PLoS ONE, 2015, 10(8): 1 - 13
- 8 张纯,徐晓娟,姚莉娟,等. 改良多囊卵巢综合征大鼠模型卵泡颗粒细胞中凋亡调控蛋白 Bcl - 2 Bax 表达的研究[J]. 四川中医, 2016, 34(6): 34 - 37
- 9 Mirta SA, Miguel AW, Man 'a IA, *et al.* The developing human ovary: immunohistochemical analysis of germ - cell - specific VASA protein, BCL - 2/BAX expression balance and apoptosis[J]. Human Reprod, 2008, 23(8): 1895 - 1901
- 10 Miramar MD, Costantini P, Ravagnan L, *et al.* NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis - inducing factor[J]. J Biol Chem, 2001, 276(19): 16391 - 16398
- 11 Longley DB, Allen WL, Mc Dermott U, *et al.* The roles of thymidylate synthase and p53 in regulating Fas - mediated apoptosis in response to antimetabolites[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(10): 3562 - 3571

- 12 Liang M, Yao G, Yin M, *et al.* Transcriptional cooperation between p53 and NF - κ B p65 regulates microRNA - 224 transcription in mouse ovarian granulosa cells[J]. Mol Cell Endocrinol, 2013, 370(1 - 2): 119 - 129
- 13 庞江琳,陈小谊,陈军剑,等. 姜黄素通过 Fas/FasL 途径诱导卵巢癌 COV504 细胞凋亡的研究[J]. 中国妇幼保健, 2016, 17: 3600 - 3602
- 14 Yang R, Xu S, Zhao Z, *et al.* Fas ligand expression and mediated activation of an apoptosis program in bovine follicular granulosa cells [J]. Gene, 2012, 493(1): 148 - 154
- 15 Lin PF, Hao YB, Guo HL, *et al.* Role of Fas/FasL on apoptosis of porcine follicular granulosa cells derived from isolated follicles during culture in vitro[J]. Dongwuxue Yanjiu, 2010, 31(3): 268 - 274
- 16 王永霞,马娜,钟兴明,等. Caspase - 3, TNF - α , bcl - 2, bax 在胎儿卵巢中的表达[J]. 中国医药导报, 2015, 12(31): 21 - 24
- 17 Tai CJ, Chang SJ, Chien LY, *et al.* Adenosine triphosphate induces activation of caspase - 3 in apoptosis of human granulosa - luteal cells [J]. Endocr J, 2005, 52(3): 327 - 335
- 18 Garcia de la Cadena S, Massieu L. Caspases and their role in inflammation and ischemic neuronal death. Focus on caspase - 12 [J]. Apoptosis, 2016, 21(7): 763 - 777
- 19 Ooi KL, Muhammad TS, Sulaiman SF. Physalin F from *Physalis minima* L. triggers apoptosis - based cytotoxic mechanism in T - 47D cells through the activation caspase - 3 - and c - myc - dependent pathways[J]. J Ethnopharmacol, 2013, 150(1): 382 - 388
- 20 Katrin EW, Heidi MH, Björn von E, *et al.* Repression of SRF target genes is critical for Myc - dependent apoptosis of epithelial cells[J]. EMBO J, 2015, 34(11): 1554 - 1571
- 21 Akiyama T, Dass CR, Choong PFM. Bim - targeted cancer therapy: A link between drug action and underlying molecular changes[J]. Mol Cancer Ther, 2009, 8(12): 3173 - 3180
- 22 Cheng JC, Klausen C, Leung PC, *et al.* Overexpression of wild - type but not C134W mutant FOXL2 enhances GnRH - induced cell apoptosis by increasing GnRH receptor expression in human granulosa cell tumors[J]. PLoS One, 2013, 8(1): 1 - 7
- 23 Cheng JC, Chang HM, Fang L, *et al.* TGF - β 1 up - regulates connective tissue growth factor expression in human granulosa cells through Smad and ERK1/2 signaling pathways[J]. PLoS One, 2015, 10(5): e0126532
- 24 马小红,何盛显,徐仙,等. 胰岛素样生长因子与卵泡发育关系的研究进展[J]. 中国妇幼健康研究, 2016, 27(3): 409 - 411
- 25 马会明,黑常春,张永芳,等. EGF 通过 PI₃K/AKT 通路介导小鼠卵巢颗粒细胞增殖[J]. 宁夏医科大学学报, 2014, 36(5): 483 - 486, 490

(收稿日期:2017 - 04 - 10)

(修回日期:2017 - 04 - 19)