

- 2017,7(1): 12200
- 20 Tailford LE, Crost EH, Kavanaugh D, *et al.* Mucin glycan foraging in the human gut microbiome[J]. *Front Genet*, 2015,6: 81
- 21 Rodriguez - Pineiro AM, Johansson ME. The colonic mucus protection depends on the microbiota[J]. *Gut Microbes*, 2015,6(5): 326 - 330
- 22 Chen GY, Liu M, Wang F, *et al.* A functional role for Nlrp6 in intestinal inflammation and tumorigenesis [J]. *J Immunol*, 2011, 186(12): 7187 - 7194
- 23 De Minicis S, Rychlicki C, Agostinelli L, *et al.* Dysbiosis contributes to fibrogenesis in the course of chronic liver injury in mice[J]. *Hepatology*, 2014,59(5): 1738 - 1749
- 24 Wree A, Eguchi A, McGeough MD, *et al.* NLRP3 inflammasome activation results in hepatocyte pyroptosis, liver inflammation, and fibrosis in mice[J]. *Hepatology*, 2014,59(3): 898 - 910
- 25 Hendrikx T, Bieghs V, Walenbergh SM, *et al.* Macrophage specific caspase - 1/11 deficiency protects against cholesterol crystallization and hepatic inflammation in hyperlipidemic mice [J]. *PLoS One*, 2013,8(12): e78792
- 26 Lemire P, Robertson SJ, Maughan H, *et al.* The NLR protein NLRP6 does not impact gut microbiota composition[J]. *Cell Rep*, 2017,21(13): 3653 - 3661
- 27 Wree A, McGeough MD, Pena CA, *et al.* NLRP3 inflammasome activation is required for fibrosis development in NAFLD[J]. *J Mol Med: Berl*, 2014,92(10): 1069 - 1082
- 28 Inzaugarat ME, Johnson CD, Holtmann TM, *et al.* NLR family pyrin domain - containing 3 inflammasome activation in hepatic stellate cells induces liver fibrosis in mice[J]. *Hepatology*, 2019,69(2): 845 - 859
- 29 Alegre F, Pelegrin P, Feldstein AE. Inflammasomes in liver fibrosis [J]. *Semin Liver Dis*, 2017,37(2): 119 - 127
- 30 Wree A, McGeough MD, Inzaugarat ME, *et al.* NLRP3 inflammasome driven liver injury and fibrosis: roles of IL - 17 and TNF in mice [J]. *Hepatology*, 2018,67(2):736 - 749
- (收稿日期:2019 - 03 - 29)  
(修回日期:2019 - 04 - 14)

## 卵巢早衰卵泡膜功能的研究进展

张宇驰 盛波 赵聪 历凯 郑义 葛鹏玲

**摘要** 卵巢早衰(premature ovarian failure, POF)是一种性腺衰竭的病症,其特征是闭经、低雌激素血症和高促性腺激素血症,POF主要存在于40岁以下的女性中,发生率为1%~3%。尽管大多数POF的病因仍然是特发性和未知的,但近期已有大量研究指出,女性胚胎期和出生后的卵泡膜功能被破坏会导致异常的卵泡形成和生长,致使原始卵泡发育障碍,从而诱发女性卵巢早衰。因此,本文对POF卵泡膜功能的研究进展进行综述,以期对POF疾病的病因学和治疗学的未来发展提供参考。

**关键词** 卵巢早衰 卵泡膜 原始卵泡

**中图分类号** R711.75 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.12.039

卵泡膜(follicular theca)是一层围绕颗粒细胞的结缔组织,由膜内腔和膜外腔组成,膜内腔含有分泌细胞,膜外腔由成纤维细胞组成。膜内腔和膜外腔均含有血管组织、免疫细胞和基质因子。卵泡膜为颗粒细胞层、卵丘细胞和卵母细胞提供营养。故卵泡膜不仅对维持卵泡结构的完整性至关重要,而且能产生关键的内分泌调节因子,如雄激素(包括睾酮和二氢睾

酮)以及生长调节因子(包括骨形态发生蛋白和转化生长因子 $\beta$ )<sup>[1]</sup>。因此,研究卵泡膜功能对卵巢疾病的影响至关重要。近年来,新的分子细胞学方法以及老鼠模型已揭示卵泡膜对卵泡生长的影响以及对卵巢早衰(POF)疾病的影响。本文将对卵泡膜功能与POF疾病的最新研究进展进行综述。

### 一、卵泡膜功能的研究

1. 卵泡膜形成的研究概况:1996年,Dong等<sup>[2]</sup>首次报道卵母细胞中的生长分化因子9(GDF9)参与调节卵泡膜形成,研究结果显示,在卵母细胞缺失GDF9的突变小鼠中卵巢功能被破坏。该研究首先在缺失GDF9的小鼠中发现小鼠卵泡停留在原始卵泡阶段,卵泡膜层不能发育。随后,在含有GDF9突变的绵羊和人类中观察到卵泡发育停滞<sup>[1]</sup>。以上研究结果首次证实从卵母细胞调节卵泡膜细胞层的功

基金项目:黑龙江省杰出青年科学基金资助项目(JC2018025);黑龙江中医药大学研究生创新基金资助项目(2018yjscx002)

作者单位:150040 哈尔滨,黑龙江中医药大学(张宇驰、盛波、葛鹏玲);157011 牡丹江医学院附属红旗医院(赵聪);150016 哈尔滨市食品药品监督管理局(历凯);430035 武汉,中国人民解放军军事经济学院门诊部(郑义)

通讯作者:葛鹏玲,教授,博士生导师,电子信箱:penglingge@126.com

能和形成<sup>[2]</sup>。然而,GDF9是如何直接或间接介导该过程的机制尚不清楚。目前,有研究表明,GDF9可能是通过激活 Hedgehog (HH) 信号通路以及诱导 BMP 信号的抑制剂 Gremlin 介导卵泡膜形成过程<sup>[3]</sup>。此外,更有最新研究指出,原始卵泡和 GDF9 的表达受卵母细胞中特定因子的调节,这些因子包括 FIGLA、LHX8、NOBOX、SOHLH1 和 SOHLH2 以及 NOTCH 信号通路的组成部分 JAG1 和 JAG2<sup>[4,5]</sup>。

Wijgerde 等<sup>[6]</sup>的研究表明,在小鼠和牛卵巢中 HH 信号通路成分的表达可能影响局部细胞模式,该途径的配体是 Desert hedgehog (DHH) 和 Indian hedgehog (IHH) 而非 Sonic hedgehog (SHH),并在生长卵泡的颗粒细胞中选择性表达,同时激活 HH 细胞表面跨膜受体 PATCHED1 (PTCH1) 和 PATCHED2 (PTCH2),PTCH1、PTCH2 存在于卵泡膜内膜、间质、成纤维细胞和血管周细胞中<sup>[7]</sup>。PTCH1/2 的激活释放抑制 PTCH1/2 的 G 蛋白样受体 Smoothed (SMO) 从而导致下游转录因子 GLI1 和 GLI2 的激活,已有研究指出,GLI1 和 GLI2 是膜前体细胞的潜在标志物<sup>[3]</sup>。SMO 的激活还可以诱导抑制因子 (PTCH2) 和 Hedgehog 相互作用蛋白 (HHIP) 在卵泡内提供自分泌负调控作用<sup>[7]</sup>。因此,HH 信号在局部水平被受到严格控制。更有研究显示,GLI1 也是人睾丸间质前体细胞的标志物<sup>[8]</sup>。

最新对 AMHR2 - Cre 小鼠研究中表明<sup>[6]</sup>: ① SMO 的过度激活导致 HHIP 被诱导,有力地证明 SMO 的激活能显著诱导 HH 信号的负调控作用;② 类固醇生成基因表达升高,包括通常在卵泡膜细胞中表达的基因 (Cyp11a1 和 Cyp17a1);③ SMO 的过度激活也导致生长卵泡膜中血管周围平滑肌细胞的缺失。该研究团队还发现,小鼠早在出生后第 8 天就明显缺乏  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 (aSMA),在整个毛囊发育过程中持续存在,并与排卵缺陷有关<sup>[9]</sup>。由此可知,胚胎卵巢中 SMO 的过度激活似乎增强了卵泡膜(和颗粒)的类固醇内分泌功能,但抑制平滑肌细胞的功能。

更有研究表明,卵母细胞衍生因子 GDF9 调节颗粒细胞中 DHH 和 IHH 的表达,从而为 GDF9 的缺失扰乱卵泡膜细胞的募集、增殖、类固醇生成进而影响卵泡生长提供了一个潜在的解释<sup>[3]</sup>。

2. 卵泡膜细胞的功能: 研究显示,类固醇生成因子 1 (SF - 1) 调节性腺和肾上腺中的类固醇生成基因<sup>[3]</sup>。该研究表明 SF - 1 在卵泡膜的内分泌细胞中

具有重要的调控作用,SF - 1 敲除小鼠主要表现为不孕,性腺、垂体促性腺激素和肾上腺缺失。基于该项研究得出,DHH 和 IHH 参与调节卵泡膜上的内分泌细胞包括肾上腺、卵泡膜细胞和 Leydig 细胞中的 SF - 1 和类固醇生成酶 Cyp11a1 的表达来调节类固醇分化和合成。同时该实验还发现 AMHR2 - Cre 小鼠中 SMO 过表达使 HH 信号激活,从而导致出生第 2 天小鼠的卵巢中肾上腺样细胞的 Shh、Star 和 Cyp21a1 表达出现异常,但不会对成年小鼠卵巢的类固醇合成有影响<sup>[6]</sup>。另一项研究表明,通过 SF - 1 / Cre 途径激活 HH 信号,导致胎鼠卵巢 Leydig 细胞表现异常及假两性的畸形<sup>[10]</sup>。以上结果表明,卵泡膜细胞中 HH 信号的激活对类固醇合成的影响并非一成不变,它具有阶段性和环境特异性。

Lee 等的研究表明,当 SF - 1 基因中的类泛素化位点 (K119、K194) 突变为精氨酸 (K119R、K194R) 时,在小鼠胚胎的睾丸和肾上腺中会出现 HH 信号的异常激活。具体地说,该研究结果显示,诱导小鼠睾丸中通常非表达的 SHH,将导致胚胎睾丸中特异性肾上腺基因 (Akr1b7 和 Cyp21a1) 和胚胎肾上腺中特异性睾丸基因 (Sox9 和 Amhr2) 的表达。同时,突变的胚胎睾丸中的 Leydig 细胞出现高表达的特异性基因 (Lhcgr、Star、Cyp17a1 和 Insl3) 和睾酮。致使睾丸发育异常,成年雄性小鼠不孕。尽管胚胎卵巢的类泛素化 SF - 1 无显著表达,并且在同一发育阶段似乎不受突变型非类泛素化 SF - 1 的影响,但雌性小鼠最终会表现不孕。如前所述,在 AMHR2 - Cre 的小鼠胚胎卵巢中,SHH 和 CYP21A1 被 SMO 过表达而激活,进一步表明胚胎性腺中内分泌前体细胞的重要性<sup>[6]</sup>。因此,有研究预测,在 SF - 1 突变的卵巢细胞中 SHH 的异常表达将可能影响卵泡膜细胞基因的表达和后期发育的功能。

值得注意的是 SMO、PTCH1 和 GLI1 在颗粒细胞中也有表达。尽管在颗粒细胞中有 HH 信号在卵泡发育过程中的作用研究,但尚未被彻底阐明。根据颗粒细胞中 HH 信号通路成分水平的增加致使 Smad1 / 5 和 BMPR1 的缺失,可得出在颗粒细胞中 BMPR1 的活性被抑制与 HH 信号通路有关。更有研究指出,在 Foxl2 敲除小鼠中 DHH mRNA 表达明显增加 HH 信号通路,Foxl2 是一个关键的颗粒细胞命运决定因素,推测 HH 信号可能被 Foxl2 调控在颗粒细胞中。

## 二、卵巢早衰卵泡膜的功能变化

1. 卵泡膜 GDF9 表达异常导致卵巢早衰: 尽管

大多数卵巢早衰(POF)的病因仍然是特发性的和未知的,但很明显,胚胎期和出生后的卵泡膜功能的破坏会导致异常的卵泡形成和生长。如前所述,小鼠卵母细胞衍生因子 GDF9 的缺失阻止了卵泡膜细胞层的组织,导致卵泡生长停滞、POF 和不孕<sup>[2]</sup>。已有报道指出,人类 GDF9 基因的突变与 POF 相关,该研究表明 GDF9 对女性卵巢功能至关重要。根据 GDF9 在卵泡发育早期卵泡膜细胞募集和功能中的关键作用,可以通过调节 GDF9 表达水平或是使 GDF9 活性因子被破坏亦或发生基因突变都将会导致 POF 的发生。GDF9 基因异常导致 POF 的原因之一是已有研究表明,在卵母细胞中表达的新生卵巢同源(NOBOX)蛋白被敲除后,GDF9 的表达被抑制导致卵泡生长停滞<sup>[4]</sup>。此外,GDF9 基因是 NOBOX 的直接靶基因。GDF9 启动子区域与 NOBOX 的结合位点相结合,从而使 GDF9 基因上游改变,导致 GDF9 的异常表达,最终 POF 发生<sup>[11]</sup>。

2. 卵泡膜基因突变导致 POF: BMP15 和 GDF9 一样,在卵母细胞中表达,并影响卵泡发育<sup>[12]</sup>。然而,与 GDF9 的功能不同,BMP15 的缺失可增加生育能力,BMP15 基因是 GDF9 异二聚体通过 BMPR2 和 ALK6 的共同受体组成的独特受体复合物,并表现出更强的活性<sup>[12]</sup>。已有研究显示,BMP15 的突变与 POF 有关,BMP15 启动子的一个突变似乎增加了由垂体同源体 1(PITX1)介导的 BMP15 转录,PITX1 是一种在卵母细胞中表达的转录因子。BMP15 的过表达降低了颗粒细胞促卵泡生长激素受体(FSHR)的表达,导致卵泡消亡<sup>[13]</sup>。但 BMP15 和 BMPR2 的突变是否与卵泡膜功能被破坏有关尚待研究确定。

最近全外显子测序在 POF 家族中的应用已经确定了一系列的新基因,这些新基因也可能像 GDF9 和 NOBOX 一样,涉及卵母细胞的丢失或改变卵泡膜功能以及随后的卵泡消亡。许多新发现的基因与减数分裂和 DNA 损伤反应有关。与减数分裂功能障碍相关的新基因包括 STAG3、HFM1、MCM8、SGO2 和 NUP107<sup>[14-18]</sup>。笔者推测未来几年,将会发现更多的新基因。

DNA 损伤反应基因突变导致染色体不稳定也将最终导致 POF。这些基因包括 NBN、WRN 和 RECQ14 基因的突变<sup>[19-21]</sup>。但上述基因在卵泡膜细胞生物学中的作用尚无研究报道,但它们可能会对卵泡膜功能产生有害影响,因为如上所述,卵母细胞中表达的任何基因的破坏都可能导致卵泡膜细胞的功能

异常,从而导致卵泡发育障碍及卵巢早衰疾病的发生。

最新研究表明,卵巢细胞中 IHH 和 DHH 的破坏或 SMO 的过度表达与卵泡膜细胞发育和功能异常有关。然而,Tsujii 等<sup>[22]</sup>研究表明在女性中,HH 信号通路基因的突变与 POF 可能无关。尽管许多基因在小鼠体内的破坏已经揭示了它们在早期卵泡发育和生育中的关键作用,但人类的类似基因突变尚未观察到(上文所述的除外)。另有研究指出,LH 受体上 LH-CGR 和 INSL3 的突变会影响卵泡膜细胞的功能和生育能力。ADAMTS19 和 IGFR2 的基因突变与 POF 有关。由于 ADAMTS19 只在胚胎卵巢表达,而不在睾丸中表达,因此 Adamts19 将受到更多关注。

### 三、展 望

卵巢早衰(POF)是导致女性不孕的重要原因之一,研究显示,POF 在育龄妇女中的发生率为 1% ~ 3%,其伴随出现的围绝经期生理和心理变化以及因性激素缺乏而引起的神经、代谢、心血管系统异常和骨质疏松等表现严重影响女性的正常生活和工作<sup>[23]</sup>。近年来,该疾病趋近于年轻化并且发生率呈逐年上升趋势,患者的发病原因不仅与遗传、免疫等因素有关,有些药物或卵巢手术也可能会引起 POF 的发生,甚至工作压力大、长期焦虑或抑郁等会给女性精神上造成极大的危害,以致出现月经不调、内分泌紊乱等症状,从而影响到卵巢的正常功能。

卵巢早衰发病机制十分复杂,涉及卵巢中基因、激素水平及信号通路多种因素,引起卵巢功能障碍。近年来关于卵巢卵泡膜功能异常导致 POF 的研究取得一定进展。卵泡膜是一个复杂的动态组织,由膜内分泌细胞、成纤维细胞、血管成分、免疫细胞以及细胞外基质组成。这些细胞和基质分子以及垂体通过提供激素、营养和结构来调节毛囊的生长;反过来,它们又受到来自颗粒细胞和卵母细胞的因子的调节<sup>[24]</sup>。因此,关注卵巢卵泡膜功能变化对卵巢早衰等性腺疾病的发病机制研究尤为重要。目前卵巢早衰卵泡膜功能研究仍较少,需开展更深入的研究与探索。

### 参考文献

- 1 Young JM, McNeilly AS. Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle[J]. *Reproduction*, 2010, 140(4):489-504
- 2 Dong J, Albertini DF, Nishimori K, et al. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis[J]. *Nature*, 1996, 383(6600):531-535
- 3 Liu C, Peng J, Matzuk MM, et al. Lineage specification of ovarian theca cells requires multicellular interactions via oocyte and granulosa

- cells[J]. *Nat Commun*, 2015, 6:6934 – 6934
- 4 Rajkovic A, Pangas SA, Ballow D, *et al.* NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte – specific gene expression[J]. *Science*, 2004, 305(5687):1157
  - 5 Vanorny DA, Mayo KE. The role of Notch signaling in the mammalian ovary[J]. *Reproduction*, 2017, 153(6):R187 – R204
  - 6 Ren Y, Cowan RG, Migone FF, *et al.* Overactivation of hedgehog signaling alters development of the ovarian vasculature in mice[J]. *Biol Reprod*, 2012, 86(6):174
  - 7 Holtz AM, Peterson KA, Nishi Y, *et al.* Essential role for ligand – dependent feedback antagonism of vertebrate hedgehog signaling by PTCH1, PTCH2 and HHIP1 during neural patterning[J]. *Development*, 2013, 140(16):3423
  - 8 Liu C, Rodriguez K, Yao HHC. Mapping lineage progression of somatic progenitor cells in the mouse fetal testis[J]. *Development*, 2016, 143(20):3700 – 3710
  - 9 Ren Y, Cowan RG, Migone FF, *et al.* Overactivation of hedgehog signaling alters development of the ovarian vasculature in mice[J]. *Biol Reprod*, 2012, 86(6):174
  - 10 Barsoum IB, Bingham NC, Parker KL, *et al.* Activation of the Hedgehog pathway in the mouse fetal ovary leads to ectopic appearance of fetal Leydig cells and female pseudohermaphroditism[J]. *Dev Biol*, 2009, 329(1):96 – 103
  - 11 Norling A, Hirschberg AL, Rodriguez – Wallberg KA, *et al.* Identification of a duplication within the GDF9 gene and novel candidate genes for primary ovarian insufficiency (POI) by a customized high – resolution array comparative genomic hybridization platform[J]. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 2014, 29(8):1818 – 1827
  - 12 Peng J, Li Q, Wigglesworth K, *et al.* Growth differentiation factor 9: bone morphogenetic protein 15 heterodimers are potent regulators of ovarian functions[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(8):E776 – E785
  - 13 Fonseca DJ, Ortega – Recalde O, Esteban – Perez C, *et al.* BMP15 c. –9C > G promoter sequence variant may contribute to the cause of non – syndromic premature ovarian failure[J]. *Reprod Biomed Online*, 2014, 29(5):627 – 633
  - 14 Caburet S, Arboleda VA, Llano E, *et al.* Mutant cohesin in premature ovarian failure[J]. *N Engl J Med*, 2014, 370(10):943 – 949
  - 15 Wang J, Zhang W, Jiang H, *et al.* Mutations in HFM1 in recessive primary ovarian insufficiency[J]. *N Engl J Med*, 2014, 370(10):972 – 974
  - 16 Tenenbaum – Rakover Y, Weinberg – Shukron A, Renbaum P, *et al.* Minichromosome maintenance complex component 8 (MCM8) gene mutations result in primary gonadal failure[J]. *J Med Genet*, 2015, 52(6):391 – 399
  - 17 Faridi R, Rehman AU, Morell RJ, *et al.* Mutations of SGO2 and CLDN14 collectively cause coincidental Perrault syndrome[J]. *Clin Genet*, 2017, 91(2):328 – 332
  - 18 Weinberg – Shukron A, Renbaum P, Kalifa R, *et al.* A mutation in the nucleoporin – 107 gene causes XX gonadal dysgenesis[J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(11):4295 – 4304
  - 19 Chrzanoska KH, Szarras – Czapnik M, Gajdulewicz M, *et al.* High prevalence of primary ovarian insufficiency in girls and young women with nijmegen breakage syndrome: evidence from a longitudinal study[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95(7):3133 – 3140
  - 20 Rossi ML, Ghosh AK, Bohr VA. Roles of Werner syndrome protein in protection of genome integrity[J]. *DNA Rep*, 2010, 9(3):331 – 344
  - 21 Siitonen HA, Sotkasiira J, Biervliet M, *et al.* The mutation spectrum in RECQL4 diseases[J]. *Eur J Hum Genet*, 2009, 17(2):151 – 158
  - 22 Tsuji T, Catusus L, Prat J. Is loss of heterozygosity at 9q22.3 (PTCH gene) and 19p13.3 (STK11 gene) involved in the pathogenesis of ovarian stromal tumors? [J]. *Hum Pathol*, 2005, 36(7):792 – 796
  - 23 徐嵘. 五子衍宗丸合四物汤加味治疗卵巢早衰的临床观察[J]. *中西医结合研究*, 2019, 11(1):28 – 29
  - 24 Richards JAS, Ren YA, Candelaria N, *et al.* Ovarian follicular theca cell recruitment, differentiation and impact on fertility: 2017 update [J]. *Endocrine Rev*, 2017, 39(1):1 – 20  
(收稿日期:2019 – 04 – 15)  
(修回日期:2019 – 04 – 16)
- 
- (上接第 76 页)
- 16 Basavaraju GS, Preeti GJ, Nanda BJ. Xanthine oxidase, nitric oxide synthase and phospholipase A<sub>2</sub> produce reactive oxygen species via mitochondria [J]. *Brain Res*, 2005, 1037(3):200 – 203
  - 17 Shah AM, Channon KM. Free radicals and redox signalling in cardiovascular disease [J]. *Heart*, 2004, 90:486 – 487
  - 18 Gueraud F, Atalay M, Bresgen N, *et al.* Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation product [J]. *Free Radic Res*, 2010, 44(10):1098 – 1124
  - 19 Köhler AC, Sag CM, Maier LS. Reactive oxygen species and excitation – contraction coupling in the context of cardiac pathology [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2014, 73:92 – 102
  - 20 Filetti FM, Vassallo DV, Fiorelli M, *et al.* Reactive oxygen species impair the excitation – contraction coupling of papillary muscles after acute exposure to a high copper concentration [J]. *Toxicol In Vitro*, 2018, 51:106 – 113  
(收稿日期:2019 – 05 – 23)  
(修回日期:2019 – 07 – 08)