

卵泡发育过程中的细胞间通讯

阮鑫 董晓英

摘要 卵泡的良好发育对女性生殖至关重要。其发育是一个复杂的过程,从卵泡的形成到卵泡发育成熟并排卵的过程在很大程度上依赖于卵泡内的生殖细胞和体细胞这两种主要细胞类型之间的通讯合作。近年来,有越来越多的研究发现在卵泡中存在着一种旁分泌途径-间隙连接细胞间通讯(gap junction intercellular communication, GJIC)。它由连接蛋白(connexin, Cx)介导,在参与卵泡的启动、窦卵泡腔的形成、卵母细胞的减数分裂等方面发挥着重要作用。故本文旨在通过细胞间通讯探索卵泡发育过程中细胞交互的机制,为提高女性生殖能力提供新思路。

关键词 细胞间通讯 间隙连接 颗粒细胞 卵母细胞 卵泡发育

中图分类号 R71 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2022.06.037

卵泡(follicle)是育龄女性生殖系统的核心功能单位,其发育的最终目的是产生一个可育的卵子,能够完成受精和胚胎发育的过程^[1]。现代社会由于环境因素、精神压力等导致原始卵泡池过早耗竭,从而导致卵巢功能过早衰退,引发卵巢储备功能下降(diminished ovarian reserve, DOR)、早发性卵巢功能不全(primary ovarian insufficiency, POI)、最终卵巢早衰(premature ovarian failure, POF),严重影响了女性的生殖能力。生育能力的衰退给女性群体带来了沉重的生理和心理负担,故维持卵泡的正常发育对女性生殖尤为重要。卵母细胞(oocyte)与颗粒细胞(granulosa cell, GC)通过一系列自分泌或旁分泌的方式调控着卵泡的正常发育。另有研究发现,旁分泌途径依赖于连接蛋白介导的间隙连接进行细胞间通讯使卵泡得到了良好的生长发育和成熟^[1,2]。本文将从能量代谢、细胞因子、信号通路3个方面探讨间隙连接介导的细胞间通讯对卵泡发育的影响。

一、卵泡的生长发育是衡量卵巢功能的标志

卵泡是卵巢中最主要的功能单位,它是由一个卵母细胞及包围卵母细胞的卵泡细胞组成。一个成熟卵泡由原始卵泡启动后经历初级卵泡、次级卵泡和三级卵泡发育而来,这一过程称为卵泡发育(follicular development)。女性的卵泡数量从一出生就固定了,因其不可再生性,卵泡数量及其发育状态决定了卵巢的生育潜能。若受到年龄、环境等因素影响,会加重

卵泡的过早耗竭。

1. GC的增殖分化影响不同阶段的卵泡发育:卵泡发育与颗粒细胞增殖密切相关。从原始卵泡向初级卵泡发育的过程中,GC的形态从单层扁平状增殖为复层立方形,并且之后随着卵泡发育不断增殖。在此过程中,颗粒细胞自身分泌表达kit配体(KITL),通过与卵母细胞上的kit受体结合使卵母细胞在出生后不久开始生长,因此颗粒细胞有助于启动原始卵泡开始生长。在有腔卵泡阶段,卵丘颗粒细胞通过帮助卵母细胞代谢葡萄糖和胆固醇,运输氨基酸等物质参与维持卵母细胞的生长发育及代谢活动。此外,在卵泡发育的后期阶段,颗粒细胞通过调节自身分泌的成熟抑制因子环磷酸鸟苷(cGMP)的浓度抑制卵母细胞中以环磷酸腺苷(cAMP)为导向的磷酸二酯酶(PDE3A)的活性,从而维持卵母细胞中高浓度的cAMP防止减数分裂过早成熟以调控卵泡发育^[2]。

2. 卵母细胞在卵泡发育过程中的核心作用:卵母细胞是卵泡中的核心细胞,卵母细胞的生长与卵泡发育相协调,故卵母细胞的发育成熟也标志着卵泡的成熟。卵母细胞起源的一系列因子在负责指导原始卵泡库的形成和激活、颗粒细胞的增殖分化、卵母细胞的成熟方面具有重要意义。如转化生长因子 β (TGF- β)超家族(包括生长分化因子9、骨形态发生蛋白家族),卵母细胞通过表达GDF-9和骨形态发生蛋白15(BMP15,也称GDF9B),促进GC不断增殖、分化促进卵泡从初级向次级、从腔前向有腔阶段的转变^[2]。在卵泡的发育过程中,卵母细胞处于优势支配地位,发挥着积极主动的作用,并且这一角色贯穿整个卵泡发育的过程。且在发育的过程中,卵母细胞中最重要的

基金项目:北京市自然科学基金资助项目(面上项目)(7212162)

作者单位:100069 北京,首都医科大学中药学院

通信作者:董晓英,副教授,主任医师,电子邮箱:softsongs@

126.com

且独特的细胞器——线粒体,是支持卵泡发育过程中最重要的能量来源^[3]。

3. 细胞间通讯是影响卵泡发育的重要因素:原始卵泡能否最终发育为一个优势卵泡并顺利排出受到很多因素的影响,如卵泡微环境、细胞因子、内分泌代谢等。其中卵泡在发育的过程中的代谢活动以自分泌以及旁分泌的方式进行,这种旁分泌途径依赖于卵母细胞或 GC 分泌的细胞因子以及由连接蛋白(Cx)介导的间隙连接来进行卵泡内物质传递和信息交流。研究表明,卵丘-卵母细胞复合物(COC)从卵泡中分离并完整培养与在卵母细胞和 GC 共培养中提供 GC 这种方式比较,前者的卵母细胞生长速度更快,卵泡中卵母细胞的生长速度与卵泡中 COC 中所含的 GC 的数量呈正比^[4]。这在一定程度上能够说明卵泡中的卵母细胞与 GC 之间的物理接触有促进卵泡发育的作用,这两种细胞通过物理接触在卵泡内进行交流的方式称作细胞间通讯(intercellular communication, IC)。颗粒细胞与卵母细胞之间的双向运作,共同调控了卵泡的生长和发育。

二、卵泡发育过程中的细胞间通讯

细胞间通讯是指细胞之间通过不同的方式进行通讯并且传递各种信息^[5]。在哺乳动物卵泡中同样也存在着这种能够进行信息交换、物质交流的通讯方式——间隙连接(gap junction, GJ)。GJ 是介导细胞质直接交换的唯一通道,这个过程称为 GJIC^[6]。

1. GJ 与 Cx 是细胞间通讯的主要桥梁:卵母细胞与颗粒细胞之间通过 GJ 进行细胞间通讯。GJ 是一种细胞间通道,允许耦联细胞间交换高达 1kDa 分子,其基本单位是连接子,它由 6 个 Cx 组成,6 个连接蛋白寡聚体形成半通道,相邻细胞的半通道对接产生间隙连接,允许特定的小分子(丙酮酸、核酸、肌醇等)、离子(钙离子等)和信号通路分子(cAMP、cGMP、IP₃ 等)在细胞间迅速交换^[2,4,7]。哺乳动物中的连接蛋白是一个完整的膜蛋白家族,大约由 20 个基因编码,所以间隙连接中存在的蛋白亚型会影响其特性,从而影响其细胞间通讯的类型和效率。在哺乳动物卵巢卵泡发生及卵母细胞成熟的所有阶段中 Cx37 和 Cx43 起关键作用,其中 Cx37 在卵泡发育的所有阶段都存在于卵母细胞和卵丘细胞中,主要参与卵母细胞与卵丘颗粒细胞之间的缝隙连接,而 Cx43 在颗粒细胞中占主导地位,主要参与 GC 之间的交流以及调节自身的增殖与分化^[4]。在连接蛋白敲除小鼠的研究中已经证明了连接蛋白在卵巢发育和卵泡

发生过程中的重要性,有研究表明,Cx37 的缺失会导致卵母细胞和卵丘颗粒细胞之间的偶合消失,在窦腔形成阶段破坏卵泡发育,使得卵泡的进展不会超过窦前晚期;Cx43 的缺失则会通过影响颗粒细胞的增殖与分化,使卵母细胞外围的颗粒细胞不能发展到第 2 层,此时的卵泡被认为是初级卵泡^[8]。Zhang 等^[7]通过蛋白质印迹实验检测到在 COC 中存在着 Cx37 的表达,从而证明卵母细胞与 GC 之间通过 Cx37 介导的连接通道进行物质交换和信息交流促进卵泡发育。

2. Cx43 介导的 GC 间通讯促进 GC 增殖与分化:Cx43 被发现是负责人类 GC 之间连接的主要蛋白类型,它在卵泡发育的所有阶段都在颗粒细胞中表达,主要调节体细胞之间的联系,随着卵泡的发育,Cx43 型的间隙连接数目会相应的增加以适应不断增殖的体细胞,其数量在卵泡后期达到最大值。Cx43 在卵泡内颗粒细胞中的循环表达受到激素和发育的调节。在对大鼠的研究中,Cx43 的表达与血清促性腺激素的变化呈正相关,发现促性腺激素(FSH)能够通过上调 Cx43mRNA 和蛋白质的表达来介导 GC 之间的交流,从而促进 GC 的增殖与分化^[9]。

3. Cx37 促进 GC 与卵母细胞的通讯交流:哺乳动物卵泡的发育是通过所有卵泡结构之间的紧密协调和相互作用而发生的。在卵泡生长早期阶段,由于卵泡细胞中缺乏 FSH 受体,故卵泡细胞和卵母细胞之间的串扰和相互作用对原始卵泡生长的开始很重要^[9]。Cx37 是连接颗粒细胞与卵母细胞之间最主要的蛋白。Teilmann 等^[10]研究发现,在小鼠单层的第 3 阶段到多层第 4 阶段卵泡的过渡期间,卵母细胞表面 Cx37 间隙连接的数量显著增加,且在卵泡发育的前窦阶段达到最大值,与小鼠卵母细胞获得减数分裂能力的阶段一致,且他们还发现卵母细胞周边有组织的 Cx37 定位丢失是卵泡闭锁的早期迹象,这表明卵母细胞和体细胞之间完整的的细胞通讯对于卵泡健康是必不可少的。此外,在卵泡发育过程中,GC 还为卵母细胞提供重要的代谢物和能量,从而帮助卵母细胞发育。

三、通过细胞间通讯影响卵泡发育的途径

1. 能量代谢:卵母细胞作为最大的哺乳动物细胞,与体细胞比较,它的发育更加消耗能量,所以卵母细胞平衡的能量代谢对卵泡的良好发育以及形成一个可育的胚胎来说至关重要^[11]。大多数哺乳动物细胞主要依赖葡萄糖进行供能,但由于卵母细胞内磷酸果糖激酶和乳酸脱氢酶活性较低,因此本身代谢葡萄

糖的能力低下,需要依赖 GC 先将葡萄糖转化为丙酮酸和乳酸,然后将代谢物进一步转移至卵母细胞的线粒体中,卵母细胞进行氧化磷酸化(OXPHOS)产生 ATP^[12]。反过来,卵母细胞又通过其自身分泌的旁分泌因子上调 GC 中的糖酵解基因来保证为其自身输送大量的丙酮酸^[11]。故在卵泡发育的过程中,卵母细胞的发育成熟主要依赖于 GC 为其提供能量底物从而进行分解供能。

2. 细胞因子:细胞因子调控着细胞的生长发育,在卵泡的发育过程中,颗粒细胞通过间隙连接开始发送信号,可能与膜相关 kit 配体有关,也被称为干细胞因子,它能触发静息期原始卵泡内的卵母细胞开始生长。同样以互补的方式,处于生长中的卵母细胞也会释放特定的细胞因子调节卵泡发育,生长分化因子 9 (GDF9)和骨形态发生蛋白 15,它们属于转化生长因子 β 超家族成员,是颗粒细胞正确增殖与分化并诱导窦腔形成的所必需的两种生长因子^[8]。研究表明,缺乏 BMP15 和 GDF9 的小鼠表现出较低的表皮生长因子受体(EGFR)的表达,从而不能促进正确的卵丘扩张以及改善自身在卵泡中的减数分裂成熟和发育能力^[13]。此外,Alam 等^[14]研究发现,BMP15 和 GDF9 能够诱导牛卵母细胞-颗粒细胞复合物(OGC)形成窦状结构,促进卵泡发育。

3. 信号通路:卵泡发育的过程中涉及多条信号通路。在初始卵泡激活阶段, PI_3K/AKT 被认为是调节卵巢休眠的主要信号通路,该通路的激活会导致其下游蛋白 FOXO₃ 的磷酸化和核输出,从而触发原始卵泡的激活^[15]。在之后的卵泡发育过程中,GC 不断增殖依赖于卵母细胞分泌的一系列生长因子,其中 TGF- β 超家族成员 BMP 与 SMAD 通路关系密切,同时也与促性腺激素第二信使 cAMP 共同参与 GC 的增殖与分化^[16]。

(1)cAMP 信号通路调控全阶段的细胞间通讯:卵母细胞在减数分裂前期的长期停滞和随后减数分裂的恢复与卵母细胞内第二信使 3',5'-单磷酸腺苷(cAMP)的水平相关^[17]。哺乳动物排卵前的减数分裂进程由卵母细胞周围的 GC 调控。颗粒细胞中产生的 cGMP 通过 GJ 扩散到卵母细胞中,cGMP 通过抑制卵母细胞裂解物中的 cAMP 磷酸二酯酶(PDE3A)的活性抑制 cAMP 水解,使卵母细胞中 cAMP 的含量保持在高浓度水平,从而维持减数分裂前期停滞^[18]。而之后在黄体生成素(LH)激增的作用下破坏 GJ 使得 cGMP 转移至卵母细胞的过程被中断^[19]。因此卵

母细胞特异性 PDE3A 增加导致卵母细胞中 cAMP 水平降低,促进减数分裂的恢复。同时 LH 水平的激增也会导致 C 型利钠肽(CNP)的含量开始下降从而降低鸟苷酸环化酶利钠肽受体 2(NPR2,也称为鸟苷酸环化酶 B)的活性使 cGMP 的水平降低,恢复减数分裂促进排卵^[20]。

(2)SMAD 通路调节排卵前的细胞间通讯:细胞外信号转化生长因子 β (TGF- β)超家族在卵泡的发育和成熟过程中有着非常重要的作用。骨形态发生蛋白 6(BMP6)属于 TGF- β 的一员,源自卵母细胞和 GC 的 BMP 配体,在预防排卵前卵泡过早黄体化方面起着关键作用^[21]。卵母细胞或颗粒细胞可能通过调节排卵期的细胞间通讯来预防过早黄体化,抑制作用机制可能为 ALK2/ALK3 介导的 SMAD1/SMAD5-SMAD4 信号通路所驱动的^[22]。

(3)PTK2 通路维持细胞间通讯的稳定性:卵母细胞和颗粒细胞区室之间最初的连接为黏附接触,随着卵泡的发育转变为黏附连接参与毛囊组织,并稳定细胞间接触,促进 GJ 的形成。黏着斑激酶(PTK2)能够充当细胞内外信号的主要整合器,其在建立或维持卵母细胞-颗粒细胞连接中起着关键作用,PTK2 能够促进或逆转细胞骨架元件的组装,这些元件能够稳定 Cx,使细胞间间隙连接更加稳定,从而更好地转导卵母细胞与 GC 之间的通讯信号^[23]。

(4)kit 通路调控排卵前的细胞间通讯:kit 受体(也称 CD117)是 III 型酪氨酸激酶,配体是干细胞因子(stem cell factor, SCF),kit 受体和 KITL 都在发育中和排卵前的卵泡中表达。KITL 为卵泡内旁分泌因子,由颗粒细胞分泌,其依赖卵泡刺激素(FSH)的调节,低浓度的 FSH 增加 GC 分泌 KITL2 以刺激卵母细胞中的 kit 受体激活和下游 PI_3K/Akt 信号转导,促进卵母细胞的生长和卵泡发育^[24]。

四、展 望

间隙连接是参与卵泡内细胞间通讯的一种重要的交流方式。在 Munakata 等^[25]对卵母细胞周围细胞数量与卵母细胞能量状态的关系的研究中得到了证实,发现颗粒细胞通过间隙连接为卵母细胞提供代谢底物使其进行氧化磷酸化产生供给自身发育的能量,卵母细胞周围的 GC 数量将决定卵母细胞的能量充足性。此外,在 Alam 等^[14]研究中发现卵母细胞又通过 GJ 为颗粒细胞提供生长分化的细胞因子促进其不断增殖进而调控卵泡的发育。因此可以认为,间隙连接在卵泡内的能量代谢、细胞增殖分化、卵母细胞

减数分裂进程等卵泡的发育过程中至关重要。但当透明带形成以后,其外围的GC如何与卵母细胞取得联系从而促进卵泡进一步发育,通过细胞间通讯如何改善卵泡的发育,以及恢复卵巢功能下降患者的生殖能力尚缺乏深入研究。故通过探索颗粒细胞与卵母细胞之间的双向通讯为进一步揭示卵泡发育机制,解决因卵巢功能下降导致的卵泡发育障碍,最终为改善女性的生殖能力提供新思路。

参考文献

- Chang HM, Qiao J, Leung PC. Oocyte – somatic cell interactions in the human ovary – novel role of bone morphogenetic proteins and growth differentiation factors [J]. *Hum Reprod Update*, 2016, 23 (1): 1 – 18
- Clarke H. Control of mammalian oocyte development by interactions with the maternal follicular environment [J]. *Results Probl Cell Differ*, 2017, 63: 17 – 41
- Tiosano D, Mears JA, Buchner DA. Mitochondrial dysfunction in primary ovarian insufficiency [J]. *Endocrinology*, 2019, 160 (10): 2353 – 2366
- Clarke HJ. Regulation of germ cell development by intercellular signaling in the mammalian ovarian follicle [J]. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2018, 7(1): e294
- Fafiún – Labora JA, O’Loughlen A. Classical and nonclassical intercellular communication in senescence and ageing [J]. *Trends Cell Biol*, 2020, 30(8): 628 – 639
- Epifantseva I, Shaw RM. Intracellular trafficking pathways of Cx43 gap junction channels [J]. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 2018, 1860(1): 40 – 47
- Zhang Y, Xu Y, Kuai Y, *et al.* Effect of testosterone on the Connexin37 of sexual mature mouse cumulus oocyte complex [J]. *J Ovarian Res*, 2016, 9(1): 82
- Chang HM, Cheng JC, Taylor E, *et al.* Oocyte – derived BMP15 but not GDF9 down – regulates connexin43 expression and decreases gap junction intercellular communication activity in immortalized human granulosa cells [J]. *Mol Hum Reprod*, 2014, 20(5): 373 – 383
- El – Hayek S, Clarke HJ. Follicle – stimulating hormone increases gap junctional communication between somatic and germ – line follicular compartments during murine oogenesis [J]. *Biol Reprod*, 2015, 93(2): 47
- Teilmann SC. Differential expression and localisation of connexin – 37 and connexin – 43 in follicles of different stages in the 4 – week – old mouse ovary [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2005, 234(1 – 2): 27 – 35
- Warzych E, Lipinska P. Energy metabolism of follicular environment during oocyte growth and maturation [J]. *J Reprod Dev*, 2020, 66 (1): 1 – 7
- Harris SE, Leese HJ, Gosden RG, *et al.* Pyruvate and oxygen consumption throughout the growth and development of murine oocytes [J]. *Mol Reprod Dev*, 2009, 76(3): 231 – 238
- Belli M, Shimasaki S. Molecular aspects and clinical relevance of GDF9 and BMP15 in ovarian function [J]. *Vitam Horm*, 2018, 107: 317 – 348
- Alam MH, Lee J, Miyano T. GDF9 and BMP15 induce development of antrum – like structures by bovine granulosa cells without oocytes [J]. *Reprod Dev*, 2018, 64(5): 423 – 431
- Li L, Shi X, Shi Y, *et al.* The signaling pathways involved in ovarian follicle development [J]. *Front Physiol*, 2021, 12: 730196
- Bertoldo MJ, Cheung MY, Sia ZK, *et al.* Non – canonical cyclic AMP SMAD1/5/8 signalling in human granulosa cells [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2019, 490: 37 – 46
- Kawamura K, Cheng Y, Kawamura N, *et al.* Pre – ovulatory LH/hCG surge decreases C – type natriuretic peptide secretion by ovarian granulosa cells to promote meiotic resumption of pre – ovulatory oocytes [J]. *Hum Reprod*, 2011, 26(11): 3094 – 3101
- Jaffe LA, Egbert JR. Regulation of mammalian oocyte meiosis by intercellular communication within the ovarian follicle [J]. *Annu Rev Physiol*, 2017, 79: 237 – 260
- Gupta A, Pandey AN, Sharma A, *et al.* Cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors: possible therapeutic drugs for female fertility regulation [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 15(883): 173293
- Baena V, Owen CM, Uliasz TF, *et al.* Cellular heterogeneity of the luteinizing hormone receptor and its significance for cyclic GMP signaling in mouse preovulatory follicles [J]. *Endocrinology*, 2020, 161 (7): bqaa074
- Lochab AK, Extavour CG. Bone morphogenetic protein (BMP) signaling in animal reproductive system development and function [J]. *Dev Biol*, 2017, 427(2): 258 – 269
- Wu HC, Chang HM, Yi Y, *et al.* Bone morphogenetic protein 6 affects cell – cell communication by altering the expression of Connexin43 in human granulosa – lutein cells [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2019, 498: 110548
- McGinnis LK, Kinsey WH. Role of focal adhesion kinase in oocyte – follicle communication [J]. *Mol Reprod Dev*, 2015, 82(2): 90 – 102
- Kidder GM, Vanderhyden BC. Bidirectional communication between oocytes and follicle cells; ensuring oocyte developmental competence [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2010, 88(4): 399 – 413
- Munakata Y, Ichinose T, Ogawa K, *et al.* Relationship between the number of cells surrounding oocytes and energy states of oocytes [J]. *Theriogenology*, 2016, 86(7): 1789 – 1798

(收稿日期: 2021 – 11 – 25)

(修回日期: 2021 – 12 – 13)