

细胞外囊泡在卵泡发育中的交互作用及其应用前景

王鹏旭 阮 鑫 董晓英

摘 要 细胞外囊泡阐述了一种全新的细胞间交流方式,成为近年来的研究热点。在卵泡发育过程中,颗粒细胞和卵母细胞间的交互作用至关重要,两者之间的交流主要是通过间隙连接进行。细胞外囊泡则主要通过其内容物对卵泡发育关键信号通路进行调节。随着对细胞外囊泡研究的不断深入,细胞外囊泡在液态活检、癌症治疗、靶向药物递送等应用上有了重大成果。本文将从卵泡发育过程中颗粒细胞和卵母细胞的交互作用和细胞外囊泡的交互作用两个方面进行综述,探讨细胞外囊泡在解决早发性卵巢功能不全的卵泡发育问题上的应用前景。

关键词 细胞外囊泡 卵泡发育 细胞交流

中图分类号 R363

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2023.11.037

细胞外囊泡(extracellular vesicle, EV)是一种由细胞释放的膜囊泡,它能够将信息传递给其他细胞甚至是远离囊泡的细胞,影响受体细胞的功能,以达到细胞间通讯的作用^[1,2]。EV的存在极其广泛,在哺乳动物体内,EV存在于体液(如血液、尿液、卵泡液、子宫液等)中,且几乎随体液遍布全身。EV可以通过不同的分子(蛋白质、脂质、核酸等)传输信号,并且可以通过包装多种分子来递送多种信息。此外,EV的内容物、大小和膜组成随着细胞来源、状态和环境条件的改变而发生一系列的动态变化^[2]。作为新型的细胞间交流方式,EV广泛参与了许多人体病理和生理过程,这个特性让它成为新的疾病标志物和有潜力的疾病治疗工具^[3]。随着对EV研究的不断深入,EV越来越多地被用于液态活检、癌症的诊断和治疗、免疫调节、靶向药物递送、组织再生和疫苗接种等。同时越来越多的研究表明,EV在女性生殖中也有着重要的通讯作用,包括卵泡发育、受精、胚胎发育及质量、胚胎植入等阶段^[4]。因此,它也成为了改善辅助生殖技术过程及效果的潜在工具。卵泡发育作为女性生殖的起始阶段,对后续生殖过程的正常进行至关重要,而EV又对卵泡发育有着重要的调节等作用。因此,本文将从EV的角度出发,与颗粒细胞(granulosa cell, GC)和卵母细胞间常规的细胞通讯方式进行对比,对它在卵泡发育过程中的交互作用进行综述,并阐述未来EV在帮助改善早发性卵巢功能不全的卵泡发育问题上有哪些可能的应用。

一、卵泡发育中颗粒细胞与卵母细胞的交互作用

在卵泡的生长过程中,涉及到GC、卵母细胞和体细胞之间旁分泌方式的交流,以及促卵泡激素(follicle-stimulating hormone, FSH)等内分泌方式的交流。其中最为重要的就是GC和卵母细胞间的交互作用,并且它们在卵泡发育的不同阶段,呈现出不同的交互作用。

1. 原始卵泡激活阶段的信号交流:自出生时,原始卵泡就存于卵巢中,它由单层扁平GC和卵母细胞组成,此时GC和卵母细胞之间直接接触。青春期中,原始卵泡会被激活,这个过程主要由卵母细胞内PI₃K/PTEN/Akt/FOXO₃信号通路介导,而且GC也在此过程发挥重要的作用。在颗粒细胞中存在着mTOR(mammalian target of rapamycin, mTOR)复合物分为mTORC1和mTORC2两种不同的复合体。mTORC1受到TSC1/TSC2(tuberous sclerosis complex, TSC)复合物的调节。且RPTOR(regulatory associated protein of mTOR, RPTOR)也是调节mTORC1复合物的关键蛋白。当对原始GC中TSC1和RPTOR的进行剔除后,GC中的mTORC1的信号会受到相应的抑制作用,随后原始卵泡的激活会更明显。该实验也表明,GC中的mTOR信号能够增加GC中KIT-受体酪氨酸激酶配体的表达,这会导致KIT配体与卵母细胞表面更多的KIT受体结合,进一步激活PI₃K信号转导,从而促进原始卵泡的激活^[5,6]。同时还有研究表明,卵母细胞中RPTOR的缺失对卵泡发育并无影响^[5]。这说明原始GC发出的mTOR信号可以促进原始卵泡的激活,且比卵母细胞发出的mTOR信号更为重要。

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,首都医科大学中医药学院

通信作者:董晓英,电子邮箱:softsongs@126.com

2. 卵泡生长阶段的信号交流:原始卵泡被激活后卵母细胞开始生长,同时 GC 也由鳞状变成立方形并开始增殖。同时,卵细胞分泌糖蛋白等成分形成透明带保护卵细胞,而多层立方 GC 则通过形成跨区域投射的结构穿透透明带与卵细胞相连^[7]。TZP 的尖端含有间隙连接,GC 和卵母细胞之间通过间隙连接输送营养物质和传递信号分子^[8,9]。GC 通过间隙连接向卵母细胞提供营养物质,这是由于卵母细胞缺少关键酶而无法充分利用葡萄糖、氨基酸和胆固醇等物质,需要 GC 的协助才能吸收^[10]。同样,卵母细胞向 GC 传递信息分子,这些信号的主要作用是调节 GC 生长和功能,如生长分化因子 - 9 (growth differentiation factor - 9, GDF - 9) 和骨形成蛋白 - 15 (bone morphogenetic protein - 15, BMP - 15),两者在卵泡发育过程中发挥重要的作用,缺乏 GDF - 9 的小鼠的 GC 最多只能发育到 2 层,缺乏 BMP - 15 的雌性小鼠虽然卵泡生长的相对正常,但卵母细胞的排卵和受精过程会受损^[11]。目前已经证明,GDF - 9 和 BMP - 15 能够发挥协同作用刺激 GC 增殖与分化、维持 GC 形态、促进 GC 产生丝状伪足、调节 GC 的糖酵解和胆固醇合成等过程^[12,13]。除了这两种重要信号分子,卵母细胞还能衍生旁分泌因子通过刺激 GC 制造丙酮酸来满足卵母细胞对营养物质的需求^[7]。

3. 卵泡成熟阶段的信号交流:在卵母细胞未受到 FSH 的信号时,其成熟会被抑制,这种抑制作用需要卵母细胞和 GC 的相互配合,即需要卵母细胞与附壁 GC 的接触以及间隙连接来维持其正常的通讯功能^[7,14]。青春期前,GC 产生的环磷酸鸟苷 (cGMP) 通过间隙连接进入卵母细胞抑制环磷酸腺苷 (cAMP) 的水解,从而抑制卵母细胞成熟;青春期后,FSH 的激增激活丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen - activated protein kinase, MAPK),MAPK 作用于 GC 来降低间隙连接的通透性,增加 GC 内 cAMP 的水平并降低卵母细胞中的 cAMP 和 cGMP,从而诱导减数分裂的恢复以及卵丘的扩张^[15]。因此,卵母细胞的成熟抑制和减数分裂的恢复阶段也同样需要 GC 和卵母细胞间的交流。

二、EV 在卵泡发育中的作用

在卵泡发育过程中,除了上述的 TZP 和间隙连接,EV 也是非常重要的通讯工具。根据 EV 的发生机制、大小、含量和功能,它们分为外泌体、微泡和凋亡小体 3 种类型^[16]。目前,很多研究已经描述了人类卵泡液中的 EV 的分子特征以及 EV 在卵泡发育中

的交互作用^[17,18],概括为以下 3 个方面:

1. EV 中的微小 RNA (miRNA) 促进卵泡发育:卵泡生长阶段,EV 传递着很多大分子物质、RNA、蛋白质、DNA 等,其中关于 miRNA 的研究最多,同时它也是发挥作用最大的分子。

从原始卵泡的激活阶段开始,EV 中的 miRNA 就参与其中。卵泡液外泌体中的 miRNA214、miRNA212 和 miRNA132 能够靶向 PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten),抑制其对 PI_3K 通路的负调节作用,从而激活蛋白激酶 B (Akt) 并开启 PI_3K 信号通路,参与调控原始卵泡的激活。此外,miRNA 调节的 PI_3K 通路还涉及卵泡成熟的各个阶段,如原始卵泡的存活、颗粒细胞排卵、周期性卵泡募集和卵母细胞减数分裂恢复等^[19]。

除了对原始卵泡的激活过程的调节,EV 中的 miRNA 在卵泡生长过程中也具有重要的作用。研究发现,多种 miRNA 会靶向并调节卵泡生长和卵母细胞成熟相关途径中的关键信号通路,例如转化生长因子 - β (transforming growth factor - β , TGF - β)、Wnt 信号通路、MAPK、表皮生长因子受体通路等。TGF - β 在卵泡生长和胚胎发育中起着重要作用;Wnt 信号通路是调节胎儿卵巢卵泡发育、卵母细胞成熟以及类固醇生成和黄体化的信号通路;MAPK 能够刺激 GC 增殖和卵丘扩张,还可以影响促黄体生成素 (luteinizing hormone, LH) 诱导的卵母细胞成熟过程。此外,MAPK 还与表皮生长因子受体通路一起,促进了卵母细胞减数分裂的恢复。例如,外泌体能够通过 miRNA 靶向和调节 GC 的 TGF - β 家族成员,影响 ACVR1 (activin A receptor type 1, ACVR1) 信号转导和 DNA 结合因子 2 (ID2) 功能,从而调节卵泡的成熟^[20]。此外,miRNA - 181a 也能靶向 TGF - β 家族成员激活素,抑制其受体的表达,从而阻断激活素对 GC 的增殖作用^[21]。

2. 卵泡吸收 EV 后促进卵泡发育:当 EV 和卵泡共同培养时,EV 会被卵丘卵母细胞复合物所吸收,并对后续卵泡的发育起着促进的作用。在对小鼠和牛的实验中,当用其卵泡液中的外泌体和卵丘 - 卵母细胞复合物共同培养后,卵丘会发生扩张且相关扩张基因的表达也会增加,而且从小卵泡中分离出的 EV 比从大卵泡中分离出的 EV 表现出更多的活性^[22]。后续对牛的研究中发现,卵泡液中的 EV 在被周围的 GC 吸收后能不同程度地刺激 GC 的增殖,并且 GC 优先从小卵泡中吸收 EV。这也说明在卵泡发育早期的

小卵泡阶段,GC 能从小卵泡中吸收更多的 EV,从而能更快地增殖^[23]。

3. EV 保护卵泡发育:EV 不仅对卵泡发育过程起着非常重要的调节作用,而且还能增强卵泡的防御系统。研究表明,在外界环境压力下,卵泡液中的外泌体能够保护细胞,免受外界影响。例如,在氧化应激期间,GC 产生的 EV 含有更高比例的抗氧化剂和其他与细胞防御相关的物质^[17,24]。有研究发现,卵丘-卵母细胞复合体在用卵泡液的 EV 处理后可减少卵丘细胞的凋亡和热休克引起的卵母细胞损伤^[17,25]。

因此,在原始卵泡的激活阶段,EV 通过包装信号分子 miRNA 来对 PI₃K 通路进行调节。随后在卵泡成长过程中,EV 作为新的通讯方式,不同于间隙连接通道,它是经过包装的,而且经过体液运输到受体细胞。虽然与传统的通讯方式不同,但卵泡发育的正常进行需要两者的共同合作。因此,EV 在帮助治疗卵泡发育问题上具有很好的前景。

三、EV 在恢复卵巢功能上的应用方向

1. 间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSC) 分泌的 EV 恢复卵巢功能:MSC 是一种多能干细胞,具有自我更新、再生和修复缺陷细胞的能力,而且它们比其他干细胞更容易从各种组织中提取。因此,它成为了再生医学的研究热点^[26]。在女性生殖领域,干细胞已被证明是恢复卵巢功能的有效治疗工具。例如,骨髓间质干细胞可以从抑制卵巢颗粒细胞凋亡、促进血管生成、减少细胞外基质沉积、抗卵巢组织纤维化、抑制炎症反应等方面促进卵巢功能的恢复^[27]。然而,异体 MSC 移植过程中可能存在免疫排斥和致瘤的风险。因此,MSC 移植的临床使用受到限制。

越来越多的研究证明,MSC 可以通过它们的旁分泌作用治疗疾病,而且 MSC 分泌的细胞外囊泡与 MSC 具有相同的作用,例如免疫调节以及组织修复和再生。目前许多研究已经说明 MSC 分泌的 EV 在治疗许多疾病方面发挥重要的作用,如肾病、肝病、心血管疾病、免疫系统和神经系统疾病等。在女性生殖领域,也有研究证明 MSC 的 EV 能够治疗卵巢早衰。这些 EV 主要从诱导血管生成,抑制 GC 凋亡,减少氧化应激等方面来促进卵巢功能的恢复^[28-30]。相比于干细胞治疗方案,EV 缺乏自我复制能力,没有异位分化的危险,不会导致肿瘤的形成;而且它没有免疫排斥反应。因此,干细胞 EV 可以为临床治疗应用提供

更安全的替代方案。

尽管有动物实验表明,MSC-衍生的 EV 对治疗卵巢早衰有一定的效果,但是目前相关临床试验数据正在进行,MSC-EV 在治疗卵巢早衰方面的安全性有待确定,而 EV 疗法的安全性将是其能否作为临床治疗的关键。如果 EV 疗法是安全的,研究人员也需要克服很多挑战:(1)为了提升 EV 疗法的治疗效率,可以从增强 EV 内的活性成分来入手,目前已有实验做了尝试。(2)应该更加了解 EV 的分子机制,制定标准化的分离和纯化方法。(3)应该寻找出大规模生产 EV 的方法。

2. 基于 EV 的药物递送:目前很多研究正在探索把 EV 作为天然药物输送载体,这是因为 EV 与传统的药物递送比较,具有多方面优势:一方面,EV 包裹后的药物更加稳定,不易被免疫系统清除;另一方面,药物能借助 EV 跨越生物屏障(如血-脑脊液屏障等)和靶向指定细胞。目前,基于 EV 的药物递送已经尝试了许多种类的化疗药物,而且证明了 EV 封装后的治疗效果更好,例如,姜黄素在封装后抗炎效果多出 3 倍,多柔比星和紫杉醇抗肿瘤作用更强,且药物有着更好的生物活性和靶向效率。但是目前缺乏标准化 EV 分离和纯化方法,而且作为载体的 EV 细胞来源并未确定。同时女性生殖领域方面的药物载体研究也很少,因此,基于 EV 的药物传输系统能否在恢复卵巢功能上应用,需要后续研究进一步探索。

四、展 望

在卵泡发育过程中,GC 和卵母细胞间常规的通讯模式主要是通过间隙连接,即通过间隙连接传输信号分子和营养物质。不同于间隙连接,EV 仅传递信号分子而不传递营养物质,它运用包装的方式,通过体液到达受体细胞传输信息,发挥调节作用,特别是通过其内容物 miRNA,EV 可以对卵泡发育过程中的很多信号通路进行调节。因此,EV 在解决卵泡发育问题方面有很好的前景。

目前 EV 已有了一些应用的方向,例如,液态活检和药物传输系统,在女性生殖领域,MSC-EV 疗法有望作为新型无细胞疗法,是解决卵巢早衰的卵泡发育问题的未来重要研究方向。除此之外,并未有很多研究去探索 EV 的治疗潜力。鉴于其他领域对 EV 作为药物递送系统的研究,也可以使用 EV 包装治疗卵巢功能的药物,或者我们可以设想通过药物如中药的有效成分对 EV 的作用过程进行干预,但这两种方法是否可行需要实验的证实。目前对 EV 的各方面应

用都还处于起步阶段,对 EV 的作用机制研究还不清楚,而且缺少标准的 EV 分离纯化方法。因此,在今后的研究中,需要对 EV 进行更细致地分析,并且在确认 EV 安全性的同时发展各种技术手段对其进行利用,这样才能将基于 EV 的治疗方式带向临床和实践。

参考文献

- 1 Yanez – Mo M, Siljander PR, Andreu Z, *et al.* Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions[J]. J Extracell Vesicles, 2015, 4: 27066
- 2 Zaborowski MP, Balaj L, Breakefield XO, *et al.* Extracellular vesicles: composition, biological relevance, and methods of study[J]. Bioscience, 2015, 65(8): 783 – 797
- 3 Ciferri MC, Quarto R, Tasso R. Extracellular vesicles as biomarkers and therapeutic tools: from pre – clinical to clinical applications[J]. Biology (Basel), 2021, 10(5): 359
- 4 Machtinger R, Baccarelli AA, Wu H. Extracellular vesicles and female reproduction[J]. J Assist Reprod Genet, 2021, 38(3): 549 – 557
- 5 Zhao Y, Feng H, Zhang Y, *et al.* Current understandings of core pathways for the activation of mammalian primordial follicles[J]. Cells, 2021, 10(6): 1491
- 6 Chen Y, Yang W, Shi X, *et al.* The factors and pathways regulating the activation of mammalian primordial follicles in vivo[J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 575706
- 7 Clarke HJ. Regulation of germ cell development by intercellular signaling in the mammalian ovarian follicle[J]. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol, 2018, 7(1): 10. 1002/wdev. 294
- 8 Baena V, Terasaki M. Three – dimensional organization of transzonal projections and other cytoplasmic extensions in the mouse ovarian follicle[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 1262
- 9 Marchais M, Gilbert I, Bastien A, *et al.* Mammalian cumulus – oocyte complex communication: a dialog through long and short distance messaging[J]. J Assist Reprod Genet, 2022, 39(5): 1011 – 1025
- 10 Fontana J, Martinkova S, Petr J, *et al.* Metabolic cooperation in the ovarian follicle[J]. Physiol Res, 2020, 69(1): 33 – 48
- 11 Belli M, Shimasaki S. Molecular aspects and clinical relevance of GDF9 and BMP15 in ovarian function[J]. Vitam Horm, 2018, 107: 317 – 348
- 12 Sanfins A, Rodrigues P, Albertini DF. GDF – 9 and BMP – 15 direct the follicle symphony[J]. J Assist Reprod Genet, 2018, 35(10): 1741 – 1750
- 13 Alam MH, Miyano T. Interaction between growing oocytes and granulosa cells in vitro[J]. Reprod Med Biol, 2020, 19(1): 13 – 23
- 14 Jaffe LA, Egbert JR. Regulation of mammalian oocyte meiosis by intercellular communication within the ovarian follicle[J]. Annu Rev Physiol, 2017, 79: 237 – 260
- 15 Turathum B, Gao EM, Chian RC. The function of cumulus cells in oocyte growth and maturation and in subsequent ovulation and fertilization[J]. Cells, 2021, 10(9): 2292

- 16 Doyle LM, Wang MZ. Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis[J]. Cells, 2019, 8(7): 727
- 17 Godakumara K, Dissanayake K, Hasan MM, *et al.* Role of extracellular vesicles in intercellular communication during reproduction[J]. Reprod Domest Anim, 2022, 57 Suppl 5: 14 – 21
- 18 王亨琴, 王晓梅, 孟凯, 等. 卵泡液中细胞外囊泡及其携带的 microRNA 对卵泡发育的作用[J]. 生物工程学报, 2020, 36(4): 632 – 642
- 19 Shomali N, Hemmatzadeh M, Yousefzadeh Y, *et al.* Exosomes: emerging biomarkers and targets in folliculogenesis and endometriosis[J]. J Reprod Immunol, 2020, 142: 103181
- 20 Da SJ, Carnevale EM, Winger QA, *et al.* Regulation of ACVR1 and ID2 by cell – secreted exosomes during follicle maturation in the mare[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2014, 12: 44
- 21 Zhang Q, Sun H, Jiang Y, *et al.* MicroRNA – 181a suppresses mouse granulosa cell proliferation by targeting activin receptor II A[J]. PLoS One, 2013, 8(3): e59667
- 22 Hung WT, Hong X, Christenson LK, *et al.* Extracellular vesicles from bovine follicular fluid support cumulus expansion[J]. Biol Reprod, 2015, 93(5): 117
- 23 Hung WT, Navakanitworakul R, Khan T, *et al.* Stage – specific follicular extracellular vesicle uptake and regulation of bovine granulosa cell proliferation[J]. Biol Reprod, 2017, 97(4): 644 – 655
- 24 Saeed – Zidane M, Linden L, Salilew – Wondim D, *et al.* Cellular and exosome mediated molecular defense mechanism in bovine granulosa cells exposed to oxidative stress[J]. PLoS One, 2017, 12(11): e187569
- 25 Rodrigues TA, Tuna KM, Alli AA, *et al.* Follicular fluid exosomes act on the bovine oocyte to improve oocyte competence to support development and survival to heat shock[J]. Reprod Fertil Dev, 2019, 31(5): 888 – 897
- 26 Matsuzaka Y, Yashiro R. Therapeutic strategy of mesenchymal – stem – cell – derived extracellular vesicles as regenerative medicine[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(12): 6480
- 27 刘梦宇, 吴氢凯. 干细胞及其外泌体治疗早发性卵巢功能不全的研究进展[J]. 国际妇产科学杂志, 2020, 47(2): 217 – 222
- 28 Yang M, Lin L, Sha C, *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cell – derived exosomal miR – 144 – 5p improves rat ovarian function after chemotherapy – induced ovarian failure by targeting PTEN[J]. Lab Invest, 2020, 100(3): 342 – 352
- 29 Ding C, Qian C, Hou S, *et al.* Exosomal miRNA – 320a is released from hAMSCs and regulates SIRT4 to prevent reactive oxygen species generation in POI[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2020, 21: 37 – 50
- 30 Yang Z, Du X, Wang C, *et al.* Therapeutic effects of human umbilical cord mesenchymal stem cell – derived microvesicles on premature ovarian insufficiency in mice[J]. Stem Cell Res Ther, 2019, 10(1): 250

(收稿日期: 2022 – 10 – 06)

(修回日期: 2022 – 10 – 26)