

褪黑素调节卵巢功能及相关机制的研究进展

范艺辉 赖东梅*

(上海交通大学医学院附属国际和平妇幼保健院, 上海市胚胎源性疾病重点实验室, 上海市临床重点专科, 上海 200030)

摘要 褪黑素是一种神经内分泌激素, 在动物体内主要由松果体合成和分泌, 具有调节昼夜节律的重要作用, 包括卵巢生物钟系统。褪黑素在外周组织器官如女性生殖器官卵巢中也发挥重要生理作用。女性生殖过程中, 卵泡不断产生并累积活性氧, 进而造成组织细胞损伤。褪黑素可通过受体依赖或者受体非依赖的机制参与卵巢功能调节。最近研究发现, 褪黑素还可通过调节细胞自噬机制发挥效应。该文就褪黑素对卵巢的保护作用及其相关机制的研究进展进行综述。

关键词 褪黑素; 氧化应激; 自噬; 卵巢功能

Research Progress of the Cytoprotective Properties of Melatonin on the Ovary

FAN Yihui, LAI Dongmei*

(The International Peace Maternity and Child Health Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai Key Laboratory of Embryo Original Diseases, Shanghai Municipal Key Clinical Speciality, Shanghai 200030, China)

Abstract Melatonin is a neuroendocrine hormone that mainly synthesized and secreted by the pineal gland. It is known to regulate circadian rhythms of many biological and reproductive functions and exerts physiological roles in various peripheral organs including ovary. ROS (reactive oxygen species) are produced within the ovarian follicles during reproductive processes. Melatonin, is implicated in the regulation of reproductive physiology through receptor-dependent and receptor-independent mechanisms. Recent studies focus on the essential role of melatonin in the regulation of autophagy. This review summarizes new findings related to beneficial effects of melatonin on the ovarian function and the mechanisms of melatonin on the ovarian follicles.

Keywords melatonin; oxidative stress; autophagy; ovarian function

褪黑素(melatonin, MLT)于1917年由MCCORD和ALLAN发现, 后于1958年由皮肤病学专家LE-RNER首次分离纯化, 因其能使蟾蜍皮肤颜色变浅的特性而命名为Melatonin。研究表明, MLT在调节昼夜节律、行为、免疫反应和生殖功能等方面具有重要作用^[1-2]。在生殖系统调节方面, 由松果体合成与分泌的MLT可通过脑脊液或血液循环途径作用于下丘脑促性腺激素释放激素(gonadotropin releasing hormone, GnRH)神经元, 通过抑制下丘脑-垂体-性

腺轴调节受光周期影响的哺乳动物的季节性繁殖活动^[3-4]。作为重要的神经内分泌激素, MLT可传递中枢信号, 调节卵巢生物钟系统。作为强大的抗氧化剂^[5], MLT对卵巢的保护作用受到广泛关注。卵巢是重要的性生殖器官, 具有产生卵子和分泌女性激素的功能。卵泡是卵巢的基本结构和功能单位, 由卵母细胞和围绕在其周围的颗粒细胞及卵泡膜细胞构成。鉴于MLT与卵泡膜细胞的相关研究较少, 故下文主要就MLT对卵巢生物钟系统、卵母细胞、颗

收稿日期: 2019-08-08

接受日期: 2019-09-16

国家重点研发计划(批准号: 2018YFC1004800、2018YFC1004802)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13795367665, E-mail: laidongmei@hotmail.com

Received: August 8, 2019

Accepted: September 16, 2019

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (Grant No.2018YFC1004800, 2018YFC1004802)

*Corresponding author. Tel: +86-13795367665, E-mail: laidongmei@hotmail.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5211>

粒细胞功能与卵巢相关临床疾病的调节作用及其机制研究进行综述。

1 卵巢中MLT的合成与分泌

MLT, 化学名称为5-甲氧基-*N*-乙酰色胺, 经典的生物合成在哺乳动物的松果体细胞内完成。松果体细胞从血液中摄取色氨酸后, 以色氨酸为原料, 经羟化酶、芳香-*L*-氨基酸脱羧酶、芳烷胺-*N*-乙酰转移酶(arylalkylamine *N*-acetyltransferase, AANAT)、乙酰复合胺-*O*-甲基转移酶(acetylserotonin *O*-methyltransferase, ASMT)等酶作用下转化为5-甲氧基-*N*-乙酰色胺, 即MLT, 其中AANAT和ASMT是MLT合成过程中的限速酶与关键酶。合成的MLT再分泌入脑脊液或外周血进入全身各组织器官(包括卵巢)发挥效应。在哺乳动物体内, MLT主要由松果体合成与分泌外, 还可由其他组织器官少量合成, 包括胃肠道、皮肤、卵巢、胎盘、睾丸、骨髓、视网膜、晶状体等^[6-7]。研究发现, AANAT和ASMT也在卵巢中高表达, 因而认为MLT可由卵巢直接合成。卵巢的颗粒细胞包括卵丘颗粒细胞以及卵母细胞均可合成MLT^[8], 合成的MLT不再分泌入血, 而是通过旁分泌、自分泌途径发挥局部抗氧化效应^[9]。

松果体中MLT的合成与分泌模式受到位于下丘脑视交叉上核(suprachiasmatic nucleus, SCN)的中枢生物钟调控, 具有昼夜节律性变化的特点, 即在黑暗的夜间MLT合成水平高并激活分泌, 在光照充足的日间合成水平低并且抑制分泌。通过检测夜间人类外周血中MLT浓度发现, MLT在3~5岁的幼年期水平最高, 而在青春期性腺发育与成熟后呈明显下降趋势^[8]。研究发现, 进行体外受精的女性卵泡液中的MLT浓度显著高于外周血中, 并且也具有昼夜节律及季节性改变, 即夜间卵泡液MLT浓度高于白天; 秋冬等日照短的季节时卵泡液MLT浓度显著高于春秋等日照长的季节^[10-12]。在卵泡发育过程中, 体积较大的卵泡中MLT浓度显著高于小卵泡, 且排卵前卵泡中MLT浓度高于血清中浓度, 提示MLT在卵泡发育、排卵过程中具有重要作用。另外, 在人类以及猪^[13]、牛^[14]、羊^[15]、大鼠^[16]、小鼠^[17]等哺乳动物卵泡液中MLT的高表达进一步反映了MLT与卵巢及生殖功能间的紧密联系。

2 MLT受体表达与作用机制

哺乳动物的MLT受体包括细胞膜受体和细胞

核受体两类, 其中膜受体属于G蛋白偶联受体家族(G protein-coupled family of receptors, GPCR), 其结构为七次跨膜蛋白, 目前已知在人类以及大多数哺乳动物体内主要有MT1和MT2两种亚型^[18], 分别由位于4号染色体q35.1的*MTNR1A*基因和位于11号染色体q21-q22的*MTNR1B*基因编码^[19]。从分子结构来看, MT1受体由350个氨基酸组成, 而MT2受体则由363个氨基酸构成, 二者具有60%的序列同源性; 从作用特点来看, MT1受体与MLT结合的亲和力较MT2受体更强, 但是二者与MLT的结合位点结构十分相似。研究人员通过X射线自由电子激光技术解析了MT1和MT2两种受体的三维结构, 发现二者都属于A类GPCR, 由包含经典的7段跨膜 α 螺旋的跨膜区、包含氨基末端和3段胞外环区的胞外区以及包含3段胞内环区、胞内第8段短螺旋和羧基末端的胞内区3个部分构成^[20-21]。在二者的晶体结构中, 位于第4和第5段螺旋之间有一开口向细胞膜的通道, 并且胞外配体可由该膜通道通向正构位点从而为配体进入结合位点提供途径。在MT2中, 该膜通道较MT1更为狭窄, 因而限制了配体进入结合位点。在MT2的胞外环区还存在另一条通向正构位点的通道, 但MT1的该通道入口由于构象差异而被完全封闭。由此揭示了二者受体选择性差异的结构基础, 为相关药物研发提供了重要依据。此外, MLT还可通过与核受体视黄酸相关孤儿核受体(retinoid orphan receptors, ROR)/视黄酸Z受体(retinoid Z receptors, RZR)结合, 进而调控基因转录发挥效应^[22]。目前已报道, 该超家族成员包括ROR α 、RZR α 、ROR α 2和RZR β , 这些核受体含有1个N末端结构域、1个DNA结合位点、1个配体结合位点、1个双锌指结构和1个铰链区。

重组褪黑素受体相关研究发现, MLT受体与不同G蛋白结合可介导多条信号通路, 比如抑制AC/cAMP/PKA/cAMP反应元件结合蛋白(cAMP responsive element binding protein, CREB)通路、激活磷脂酶C(PLC)- β 通路、激活Raf/MEK1/2/ERK1/2信号通路、激活PI3K/Akt(PKB)通路等, 发挥多种效应^[23]。其中, MLT与MT1受体结合后可下调细胞内PKA活性, 减少CREB磷酸化, 从而抑制cAMP信号转导级联反应, 调节细胞活动。活化的MT1受体还可诱导一过性的胞质钙离子与磷酸肌醇浓度升高。此外有研究发现, 在小鼠卵巢中, MLT可通过MT1受体介导

的途径,上调细胞内AMPK信号通路^[24]。MT2受体介导的信号则与多条通路相关,包括激活MT2受体促进磷酸肌醇产生,抑制腺苷酸环化酶以及抑制鸟苷酸环化酶等,进而调节下游通路,发挥效应^[25]。

MLT通过受体依赖的机制参与昼夜节律调节,促进组织器官间的协同作用。哺乳动物体内广泛分布的MLT受体为之奠定了生物学基础。在啮齿类动物中,MLT受体mRNA在中枢神经系统中高表达,如SCN及其他脑区如视前区、嗅球、前额叶皮层、小脑皮质等,并且在许多外周器官中高表达,包括肾、肾上腺、胃肠道、心脏、肺、皮肤、睾丸和卵巢^[26]。在人类中,MLT受体也在许多器官组织中表达,包括SCN、下丘脑中神经组织及视网膜、心血管系统、腮腺、胰腺、肝、胆囊、免疫细胞、脂肪细胞、卵巢、子宫肌层和皮肤等外周器官组织。进一步研究发现,人类及其他哺乳动物卵巢、卵巢颗粒细胞以及黄体细胞上均发现MT1和MT2两种受体^[27-28]。此外,大鼠卵丘颗粒细胞中表达ROR α ^[29]。

MLT还可通过受体非依赖机制保护生命过程中的重要分子对抗缺血/再灌注损伤、电离辐射和药物毒性等情况下产生的氧化应激损伤效应^[30]。MLT由于其分子量小和高度亲脂性的结构特点可直接进入细胞及细胞器内发挥作用。氧分子作为代谢基础物质,通过线粒体氧化磷酸化的途径为机体供能,但是这一过程中产生的自由基和活性氧(reactive oxygen species, ROS)会损害线粒体,从而影响细胞的生理功能,随着损害的累积最终导致细胞死亡。MLT及其胞内代谢产物如AMK可直接清除自由基及毒性代谢物继而形成抗氧化级联反应,发挥强大的清除自由基作用,直接下调细胞内ROS水平,维持胞内氧化还原平衡,从而维护内环境稳态^[31]。同时,MLT还可激活细胞内抗氧化防御系统如超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、谷胱甘肽还原酶(glutathione-reductase, GSH-Rd)以及葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD)等,间接促进抗氧化效应^[2]。

3 MLT调节卵巢生物钟

昼夜节律,即生物钟,是指以约24 h为周期的生理过程振荡模式,由位于下丘脑视交叉上核的中枢生物钟和外周组织中的外周生物钟组成。从分子水平来看,生物钟系统由核心生物钟基因与钟控基因

的转录翻译反馈环路组成。中枢生物钟SCN通过视神经下丘脑通路感知环境光照/黑暗变化信息后,再调节各种神经、体液及其他信号因子的分泌进而控制外周生物钟,使二者保持同步化,协调环境变化与生命活动。生物钟系统对卵巢生理活动具有重要作用,参与调节排卵、类固醇激素合成和卵母细胞成熟。研究发现,卵巢也表达生物钟基因,是具有自主调节网络的外周生物钟,同时接受中枢生物钟的控制^[32]。生物钟节律紊乱可造成卵巢功能严重受损。研究发现,生物钟基因*Per1*和*Per2*功能缺失性突变造成雌性小鼠的卵泡数量及产仔数显著减少,导致卵巢储备耗竭,生育力下降^[33]。卵巢类固醇合成细胞与卵泡膜细胞中生物钟基因*Bmal1*条件性敲除造成小鼠生育力及产仔数量下降^[34-35]。

中枢生物钟SCN调控的MLT可能是传递生物钟信号的重要因子,促进中枢信号传递至卵巢并调节卵巢局部生物钟基因表达模式及其功能(图1)。研究发现,大鼠卵巢中表达生物钟基因(*Clock*、*Bmal1*、*Per2*、*Cry1*),并且在卵母细胞成熟过程中,卵丘卵母细胞复合体(cumulus-oocyte complexes, COCs)中*Clock*、*Per2*、*Cry1*与MLT相关基因(*Aanat*、*Asmt*)表达水平发生由高到低的规律性变化,而*Bmal1*表达水平变化与前者相反。切除松果体可造成COCs中上述基因的表达模式大多数发生逆转性改变,而通过饮水给予MLT可有效改善松果体切除所致的基因表达紊乱并使之恢复正常^[29]。

4 MLT促进卵母细胞成熟及其胚胎发育潜能

哺乳动物生殖过程中,卵母细胞成熟是成功受精及胚胎发育的必要前提,而卵母细胞成熟与后续受精及胚胎发育能力共同反映了卵母细胞质量。从细胞生物学行为来看,卵母细胞成熟可分为核成熟与胞质成熟。其中,核成熟是指染色质分离的完成,表现为停滞于第一次减数分裂前期(prophase I, PI)的初级卵母细胞恢复减数分裂,并于完成第一次减数分裂后进入第二次减数分裂并停滞于中期(meta-phase II, MII),伴随着生发泡破裂、第一极体排出、卵丘颗粒细胞扩散等一系列生物学过程,亦称减数分裂成熟。然而对复杂的胞质成熟过程的认识尚未明确,目前认为胞质成熟是指卵母细胞内各细胞器的重分布,包括皮质颗粒(cortical granules, CGs)、线

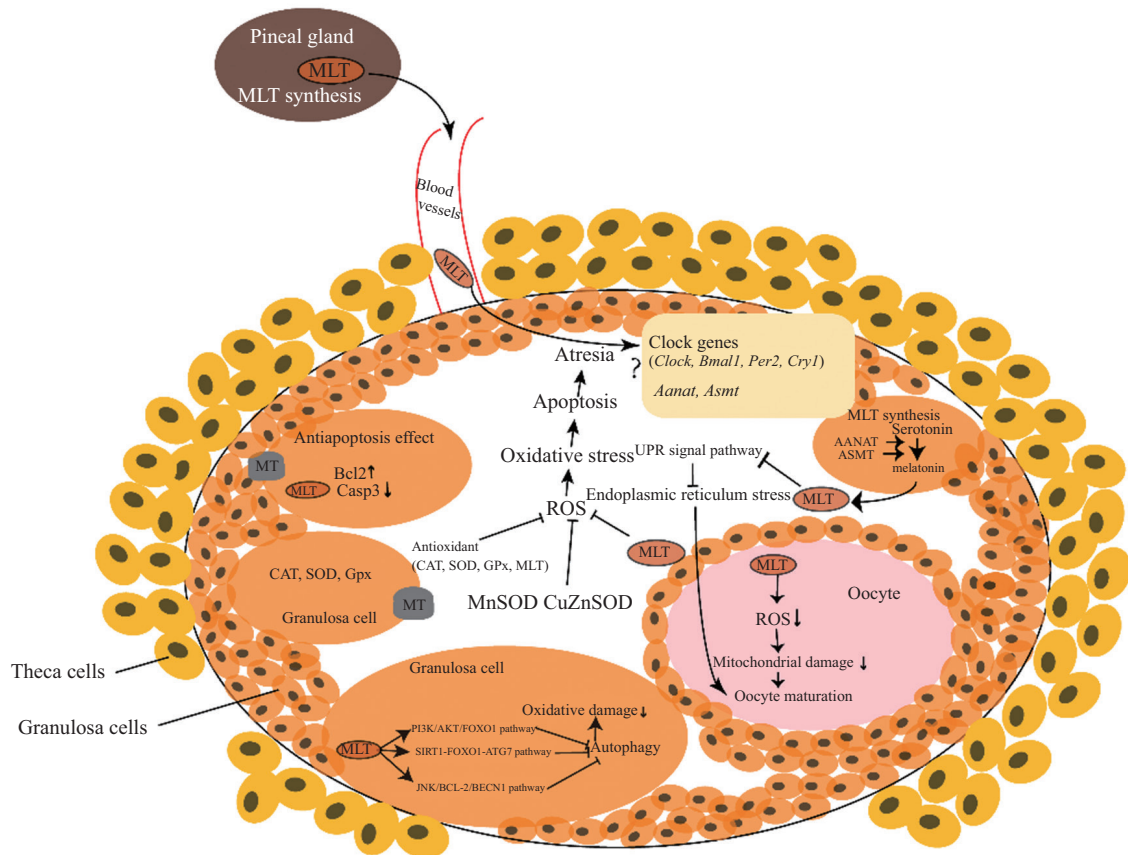


图1 褪黑素对卵泡调节作用示意图(根据参考文献[27]修改)

Fig.1 Schematic representation of the presumed roles of melatonin in ovarian follicles (modified from reference [27])

粒体及细胞骨架系统等^[36-37]。值得注意的是,细胞核与胞质成熟并非两个独立过程,二者成熟的同步化对受精与胚胎发育极为重要。卵母细胞减数分裂成熟依赖于严格的纺锤体组装与染色体分配,而卵母细胞胞质内储存的大量线粒体是支持该过程以及接下来早期胚胎发育的重要能量来源。只有高质量的成熟卵母细胞才能进一步成功受精或借由体外辅助生殖技术实现并发育为健康的新生命。

4.1 MLT促进卵母细胞成熟

ROS是细胞代谢过程中的正常产物,并对细胞生理活动具有重要作用,但是ROS的过度产生与抗氧化清除作用间的失衡所导致的氧化应激可造成细胞损伤^[38]。在卵巢中,ROS广泛存在于各生理活动并具有重要作用,但当ROS产生过多时,可导致氧化应激反过来破坏卵巢的生理过程^[39]。人工助孕技术,包括体外成熟(*in vitro* maturation, IVM)、体外移植(*in vitro* fertilization, IVF)等体外培养条件下的卵母细胞暴露于含氧量较高的环境下(有别于体内低氧的环境),细胞内的氧化应激水平更高,并且缺乏健全的清

除氧自由基和抗氧化的机制,因而可对卵母细胞造成严重损伤。研究表明,MLT作为强大的抗氧化剂,有利于卵母细胞成熟和胚胎发育。临床上给予口服MLT可降低不孕女性卵母细胞内氧化应激标志物8-OHdG水平,提高IVF-ET治疗下的受精率^[40]。在模式动物研究中,MLT对次氯酸诱导的小鼠M II卵母细胞微管和染色体异常具有保护作用,通过上调卵丘细胞中抗氧化分子MnSOD和CuZnSOD转录水平从而降低卵母细胞中的ROS水平,发挥抗氧化作用,并通过抑制卵巢中Bax蛋白表达水平,降低Bax/Bcl-2比值,从而减少细胞凋亡^[41]。研究还发现,MLT可通过强大的自由基清除作用,显著降低IVM过程中牛卵母细胞ROS水平,改善卵母细胞的氧化应激状态,减少卵母细胞早期凋亡,修复线粒体的完整性,改善纺锤体装配和染色体排列,促进其减数分裂成熟^[42]。MLT除了对核成熟具有显著的促进作用外,对胞质成熟也有重要作用。例如,ZHAO等^[43]发现,在IVM过程中应用1 nmol/L的MLT可改善牛卵母细胞线粒体、内质网等细胞器重分布,增加细胞内GSH及

ATP水平,提高内源性抗氧分子CAT、SOD1、GPx的表达,进而促进卵母细胞质成熟,提高受精能力及发育能力。

在亚细胞水平上,已明确线粒体对卵母细胞成熟的重要作用^[44]。MLT可调节线粒体结构与功能,从而提高卵母细胞质量^[45]。此外,最近有研究聚焦于内质网在卵母细胞成熟过程中的作用,发现MLT可通过对内质网的调节进而影响卵母细胞。内质网是细胞内参与新生肽链折叠、组装与转运的细胞器,目前被认为是细胞应激反应通路的主要组织者。当缺氧、饥饿、氧化应激、异常糖基化反应以及钙离子稳态失衡时,内质网内未折叠的蛋白质与错误折叠蛋白大量累积,导致内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ER stress)。此时,未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)被激活应对内质网应激,即位于内质网上的3个UPR感受器PERK(PKR-like eukaryotic initiating α kinase)、ATF6(activating transcription factor 6)及IRE1(inositol requiring enzyme 1)与伴侣蛋白BiP/GRP78解离,PERK和IRE1发生寡聚化,ATF6转位至高尔基体并激活下游信号分子,恢复内质网环境,促进细胞生存。但大量或持续性内质网应激超出UPR的调节能力时,对细胞产生毒性,进一步启动细胞的凋亡程序,从而导致细胞的死亡。因而对内质网应激的应答反应被认为是调控细胞生存和凋亡的重要信号通路^[46]。研究报道,内质网应激应答反应在调节女性生殖过程如卵泡闭锁、胚胎植入、胎盘发育等过程中具有重要生理作用^[47]。PARK等^[48]发现,IVM过程中,猪COCs中的*Bip/Grp78*、*Atf4*、*P50Atf6*等UPR信号基因与凋亡分子*Chop*的转录及翻译水平升高,内质网应激水平显著上调。而通过在IVM培养体系中添加MLT可下调*Atf4*、*P50Atf6*、*Chop*表达水平,有效改善内质网应激,提高卵母细胞减数分裂成熟率,促进卵丘细胞扩张。

MLT除了通过非受体依赖途径发挥抗氧化效应,还可通过与MT1受体结合作用以提高卵母细胞质量。进一步机制研究发现,MLT通过介导MT1受体依赖途径,上调胞内去甲基化酶TET1蛋白水平,下调DNA甲基转移酶DNMT1水平,从而降低精卵融合相关基因*CD9*和*Juno*的甲基化水平以提高M II卵母细胞的受精能力^[49]。体内研究发现,MLT可通过增加皮质颗粒蛋白酶ovastacin的表达,上调*Juno*的表达,促进精子与透明带以及卵母细胞的结合,增加

卵母细胞受精率^[49]。LAN等^[50]发现,MLT可改善脱氧雪腐镰刀菌所导致的小鼠卵母细胞H3K9me2水平下降与5甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, 5mC)水平升高,提高早期胚胎卵裂率。可见,MLT可能通过表观遗传机制进而改善卵母细胞质量。

目前IVF-ET技术已被广泛用于各种不育症的临床治疗。此治疗过程中常应用大量促性腺激素刺激卵巢以获得尽可能多的成熟卵母细胞,而这种方法会引发一系列问题,如卵巢过度刺激综合征(ovarian hyperstimulation syndrome, OHSS)、部分患者因对促性腺激素反应低下而促排卵失败、卵巢癌发病风险增加等;而使用未成熟的卵母细胞进行体外成熟的方法则将有效避免上述不良事件。目前人未成熟卵母细胞的IVM技术现已在临床上开始初步应用,但是相较于其他哺乳类动物,人未成熟卵母细胞的体外成熟率、受精率以及种植后的妊娠率均显著低下。因此,MLT对卵母细胞体外成熟的促进作用及其机制的揭示将有助于IVF-ET技术的发展。

4.2 MLT促进卵母细胞的早期胚胎发育潜能

排卵后未能在最佳受精时间窗内完成受精的卵母细胞会表现出形态与功能下降,被称为排卵后卵母细胞老化(postovulatory oocyte aging, POA),最终凋亡。超促排后卵母细胞的体外培养过程中,常会发生POA,导致卵母细胞受精能力、早期卵裂能力受损及早期胚胎发育异常,进而影响卵母细胞发育潜能。体外研究发现,MLT对排卵后老化的小鼠卵母细胞具有保护作用,通过SIRT1(sirtuin1)-Mn-SOD依赖通路,下调老化诱导的ROS水平及caspase表达升高,改善氧化应激水平,延缓凋亡启动,并延长最佳受精时间窗,增加其囊胚形成率,从而促进老化卵母细胞的胚胎发育潜能^[51-52]。WANG等^[53]发现,2 mmol/L的MLT可有效改善老化的猪卵母细胞的胞质不均质,维持正常形态,并提高其孤雌激活重构胚的囊胚形成率,通过抑制ROS水平升高,上调抗氧化基因*GPx4*、抗凋亡基因*Bcl-xl*的表达,提高线粒体膜电位水平,进而促进卵母细胞的发育潜能。可见,MLT可通过直接抗氧化作用促进老化卵母细胞的胚胎发育及质量。

5 MLT对颗粒细胞的保护作用

哺乳动物卵巢发育过程中,约99%的卵泡未能发育为成熟卵泡而是走向闭锁^[54]。卵泡发育过程中

ROS的不断累积使细胞处于氧化应激状态,导致颗粒细胞损伤,从而引起卵泡闭锁。有研究发现,大鼠颗粒细胞凋亡与胞内自噬水平升高相关,并且自噬是氧化应激诱导颗粒细胞死亡的重要机制^[55]。自噬是真核细胞利用自身溶酶体程序性地消化自身且形成特征性自噬小体,清除自身受损的细胞器和大分子物质从而有利于细胞生存的过程,但是自噬水平过高时可导致细胞死亡,故又被称为“II型程序性死亡”^[56]。目前研究已证明,MLT可通过抑制自噬,改善氧化应激诱导的颗粒细胞活力下降,并且这种MLT对颗粒细胞的保护作用与其抗氧化作用无关^[57]。

5.1 MLT通过抑制FOXO1依赖的自噬信号通路保护颗粒细胞

转录调节因子FOXO1,叉头转录因子O亚家族(subfamily O of Forkhead transcription factor)的成员之一,是细胞自噬负性调节途径PI3K/AKT信号通路的下游信号分子,可通过亚细胞定位与翻译后修饰如磷酸化、乙酰化和泛素化等机制发挥效应^[58],参与调节细胞氧化应激、增殖、分化、细胞死亡等。FOXO1在生长卵泡颗粒细胞中特异性高表达,并且FOXO1在卵泡闭锁过程中主要定位于颗粒细胞的细胞核^[59-60]。SHEN等^[57]发现,MLT通过激活PI3K/AKT/mTOR信号通路,促进FOXO1磷酸化及从细胞核转移至细胞质,从而抑制FOXO1转录活性并抑制下游自噬相关基因的表达,抑制自噬应答反应,进而促进颗粒细胞对氧化应激的耐受力。此外,MLT还可通过调节FOXO1乙酰化影响自噬活性。乙酰化FOXO1与ATG7结合形成复合体可促进自噬活性。MLT可通过增加FOXO1与去乙酰化酶SIRT1结合的亲和力从而抑制过氧化氢诱导的FOXO1乙酰化进而促进FOXO1-ATG7复合体解离,减少氧化应激导致的自噬性细胞死亡。

5.2 MLT通过抑制JNK依赖的自噬信号通路保护颗粒细胞

JNK(c-Jun N-terminal kinase)是MAPK家族成员,具有调节细胞增殖、分化、衰老、自噬、代谢等多种细胞生命活动的功能。研究表明,JNK参与ROS所致的颗粒细胞凋亡过程以及肥胖所致的颗粒细胞功能障碍过程^[61-62]。CAO等^[63]发现,MLT通过抑制JNK信号,下调其下游信号分子BECN1的表达,促进BCL-2/BECN1复合体的形成,从而抑制细胞自噬,保护颗粒细胞对抗氧化应激。生理条件下,酵母

ATG6的哺乳动物同源物BECN1与BCL-2家族成员结合,而当应激条件下,BECN1与BCL-2解离从而促进细胞自噬。

6 褪黑素对卵巢功能不全的治疗潜能

早发性卵巢功能不全(premature ovarian insufficiency, POI)是一种病因尚未完全明确并且十分复杂的疾病,发生于40岁前的女性,其特点包括闭经、促性腺激素升高、雌激素降低、不孕与围绝经期综合征等卵巢功能衰竭表现^[64]。目前认为,常见病因包括遗传、自身免疫疾病、毒理、医源性因素(手术、放化疗)等。这些因素所诱导的卵巢内卵泡过度激活、卵泡数量提早耗竭与卵泡质量下降及功能障碍是POI的共同发生机制。生理情况下,年龄相关的卵巢功能减退是导致女性随衰老导致生育力下降的主要原因。研究发现,长期给予含MLT的饮用水可改善衰老所致的小鼠各级卵泡数量减少,提高卵母细胞受精率与囊胚形成率^[65],改善卵巢功能。有研究发现,饮食中给予MLT对雷公藤多苷诱导的小鼠卵巢功能不全具有保护作用,由受体依赖途径介导,激活SIRT1信号通路,上调*Sod*、*GSH-Px*及*Bcl-2*等基因表达,改善卵巢的氧化应激状态及凋亡损伤,增加卵泡数量,减少闭锁卵泡^[66]。

研究已明确,化疗药物对卵巢的损伤作用^[67],即药物可作用于卵母细胞和颗粒细胞,影响卵泡生长和发育,引起卵泡破坏和卵巢纤维化,导致卵巢储备减少,生育能力下降,最终导致POI的发生^[67]。RICASSIO等^[68]发现,腹腔注射MLT(20 mg/kg)可通过MT1受体依赖途径介导,降低卵母细胞ROS水平,提高GSH水平及线粒体活性,减少卵母细胞及颗粒细胞凋亡,保护经顺铂化疗损伤的小鼠卵巢。有研究发现,MLT可通过抑制PTEN/AKT/FOXO3a信号通路的活化,减少顺铂诱导的小鼠原始卵泡过度激活,从而保护卵巢功能^[69]。此外,JANG等^[70]发现,MLT和胃饥饿素的协同效应可通过调节原始卵泡内FOXO3a磷酸化与结合至P27^{Kip1}从而保护顺铂诱导的卵巢损伤,恢复顺铂作用后的卵巢的原始卵泡和黄体的数量。P27^{Kip1}是细胞周期蛋白依赖性抑制因子,通过使细胞不能通过G₁期,从而调节细胞周期使细胞增殖受阻,对原始卵泡休眠状态的恢复十分关键。在原始卵泡中,MLT和胃饥饿素可抑制FOXO3a磷酸化,从而增加FOXO3a与P27^{Kip1}结合的亲和力,

从而有助于恢复顺铂诱导的原始卵泡减少。

7 小结与展望

MLT作为重要的神经内分泌激素,调控卵巢生物钟基因表达,在卵母细胞成熟过程中具有重要生理作用,但是其具体机制有待于进一步研究。MLT对于生物钟紊乱所致的卵巢功能受损是否具有调节或保护作用也值得探讨。医源性因素、环境污染、电离放射、营养不良及不健康的生活方式如吸烟、酗酒等可促进卵泡中ROS的累积^[71],造成卵巢损伤。研究发现,MLT通过受体依赖及非依赖作用途径对氧化应激所导致的卵母细胞及颗粒细胞的损伤发挥保护作用,包括MT1介导信号通路、抗氧化作用以及调节细胞自噬。此外,MLT还可通过调节内质网应激、SIRT1介导的信号通路以及表观遗传修饰等保护卵巢的功能。总之,MLT为卵巢相关疾病的治疗提供新的思路与方向,但真正到达临床应用及其效用评价还有待于更进一步的研究。

参考文献 (References)

- [1] REITER R J, TAN D X, TAMURA H, et al. Clinical relevance of melatonin in ovarian and placental physiology: a review [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2014, 30(2): 83-9.
- [2] TAMURA H, TAKASAKI A, TAKETANI T, et al. Melatonin as a free radical scavenger in the ovarian follicle [J]. *Endocr J*, 2013, 60(1): 1-13.
- [3] REITER R J. The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals [J]. *Endocr Rev*, 1980, 1(2): 109-31.
- [4] MALPAUX B, MIGAUD M, TRICOIRE H, et al. Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin [J]. *J Biol Rhythms*, 2001, 16(4): 336-47.
- [5] CRUZ M H, LEAL C L, CRUZ J F, et al. Essential actions of melatonin in protecting the ovary from oxidative damage [J]. *Theorigenology*, 2014, 82(7): 925-32.
- [6] REITER R J, ROSALES-CORRAL S A, MANCHESTER L C, et al. Peripheral reproductive organ health and melatonin: ready for prime time [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(4): 7231-72.
- [7] REITER R J, TAN D X, OSUNA C, et al. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review [J]. *J Biomed Sci*, 2000, 7(6): 444-58.
- [8] REITER R J, TAMURA H, TAN D X, et al. Melatonin and the circadian system: contributions to successful female reproduction [J]. *Fertil Steril*, 2014, 102(2): 321-8.
- [9] TAN D X, MANCHESTER L C, HARDELAND R, et al. Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin [J]. *J Pineal Res*, 2003, 34(1): 75-8.
- [10] BRZEZINSKI A, SEIBEL M M, LYNCH H J, et al. Melatonin in human preovulatory follicular fluid [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1987, 64(4): 865-7.
- [11] RONNBERG L, KAUPPILA A, LEPPALUOTO J, et al. Circadian and seasonal variation in human preovulatory follicular fluid melatonin concentration [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1990, 71(2): 492-6.
- [12] YIE S M, BROWN G M, LIU G Y, et al. Melatonin and steroids in human pre-ovulatory follicular fluid: seasonal variations and granulosa cell steroid production [J]. *Hum Reprod*, 1995, 10(1): 50-5.
- [13] HE Y, DENG H, JIANG Z, et al. Effects of melatonin on follicular atresia and granulosa cell apoptosis in the porcine [J]. *Mol Reprod Dev*, 2016, 83(8): 692-700.
- [14] EL-RAEY M, GESHI M, SOMFAI T, et al. Evidence of melatonin synthesis in the cumulus oocyte complexes and its role in enhancing oocyte maturation *in vitro* in cattle [J]. *Mol Reprod Dev*, 2011, 78(4): 250-62.
- [15] XIAO L, HU J, SONG L, et al. Profile of melatonin and its receptors and synthesizing enzymes in cumulus-oocyte complexes of the developing sheep antral follicle—a potential estradiol-mediated mechanism [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2019, 17(1): 1.
- [16] SAKAGUCHI K, ITOH M T, TAKAHASHI N, et al. The rat oocyte synthesizes melatonin [J]. *Reprod Fertil Dev*, 2013, 25(4): 674-82.
- [17] AMIREAULT P, DUBE F. Serotonin and its antidepressant-sensitive transport in mouse cumulus-oocyte complexes and early embryos [J]. *Biol Reprod*, 2005, 73(2): 358-65.
- [18] REPPERT S M, WEAVER D R, GODSON C. Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 1996, 17(3): 100-2.
- [19] JOCKERS R, DELAGRANGE P, DUBOCOVICH M L, et al. Update on melatonin receptors: IUPHAR Review 20 [J]. *Br J Pharmacol*, 2016, 173(18): 2702-25.
- [20] STAUCH B, JOHANSSON L C, MCCORVY J D, et al. Structural basis of ligand recognition at the human MT1 melatonin receptor [J]. *Nature*, 2019, 569(7755): 284-8.
- [21] JOHANSSON L C, STAUCH B, MCCORVY J D, et al. XFEL structures of the human MT2 melatonin receptor reveal the basis of subtype selectivity [J]. *Nature*, 2019, 569(7755): 289-92.
- [22] SLOMINSKI R M, REITER R J, SCHLABRITZ-LOUTSE-VITCH N, et al. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2012, 351(2): 152-66.
- [23] LUCHETTI F, CANONICO B, BETTI M, et al. Melatonin signaling and cell protection function [J]. *Faseb J*, 2010, 24(10): 3603-24.
- [24] ZHANG L, ZHANG Z, WANG J, et al. Melatonin regulates the activities of ovary and delays the fertility decline in female animals via MT1/AMPK pathway [J]. *J Pineal Res*, 2019, 66(3): e12550.
- [25] PANDI-PERUMAL S R, TRAKHT I, SRINIVASAN V, et al. Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways [J]. *Prog Neurobiol*, 2008, 85(3): 335-53.
- [26] LI D Y, SMITH D G, HARDELAND R, et al. Melatonin receptor genes in vertebrates [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(6): 11208-23.
- [27] TAMURA H, NAKAMURA Y, KORKMAZ A, et al. Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications [J]. *Fertil Steril*, 2009, 92(1): 328-43.
- [28] KANG J T, KOO O J, KWON D K, et al. Effects of melatonin on *in vitro* maturation of porcine oocyte and expression of melatonin

- receptor RNA in cumulus and granulosa cells [J]. *J Pineal Res*, 2009, 46(1): 22-8.
- [29] COELHO L A, PERES R, AMARAL F G, et al. Daily differential expression of melatonin-related genes and clock genes in rat cumulus-oocyte complex: changes after pinealectomy [J]. *J Pineal Res*, 2015, 58(4): 490-9.
- [30] REITER R J, TAN D X, GALANO A. Melatonin: exceeding expectations [J]. *Physiology (Bethesda)*, 2014, 29(5): 325-33.
- [31] MANCHESTER L C, COTO-MONTES A, BOGA J A, et al. Melatonin: an ancient molecule that makes oxygen metabolically tolerable [J]. *J Pineal Res*, 2015, 59(4): 403-19.
- [32] SELLIX M T. Circadian clock function in the mammalian ovary [J]. *J Biol Rhythms*, 2015, 30(1): 7-19.
- [33] ZHENG Y, LIU C, LI Y, et al. Loss-of-function mutations with circadian rhythm regulator *Per1/Per2* lead to premature ovarian insufficiency in mice [J]. *Biol Reprod*, 2019, 100(4): 1066-72.
- [34] MERENESS A L, MURPHY Z C, FORRESTEL A C, et al. Conditional deletion of *bmal1* in ovarian theca cells disrupts ovulation in female mice [J]. *Endocrinology*, 2016, 157(2): 913-27.
- [35] LIU Y, JOHNSON B P, SHEN A L, et al. Loss of *BMAL1* in ovarian steroidogenic cells results in implantation failure in female mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(39): 14295-300.
- [36] LONERGAN P, FAIR T. Maturation of oocytes *in vitro* [J]. *Annu Rev Anim Biosci*, 2016, 4: 255-68.
- [37] MAO L, LOU H, LOU Y, et al. Behaviour of cytoplasmic organelles and cytoskeleton during oocyte maturation [J]. *Reprod Biomed Online*, 2014, 28(3): 284-99.
- [38] VALKO M, LEIBFRITZ D, MONCOL J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39(1): 44-84.
- [39] RIZZO A, ROSCINO M T, BINETTI F, et al. Roles of reactive oxygen species in female reproduction [J]. *Reprod Domest Anim*, 2012, 47(2): 344-52.
- [40] TAMURA H, TAKASAKI A, MIWA I, et al. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate [J]. *J Pineal Res*, 2008, 44(3): 280-7.
- [41] LOREN P, SANCHEZ R, ARIAS M E, et al. Melatonin scavenger properties against oxidative and nitrosative stress: impact on gamete handling and *in vitro* embryo production in humans and other mammals [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(6): 1119.
- [42] AN Q, PENG W, CHENG Y, et al. Melatonin supplementation during *in vitro* maturation of oocyte enhances subsequent development of bovine cloned embryos [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(10): 17370-181.
- [43] ZHAO X M, WANG N, HAO H S, et al. Melatonin improves the fertilization capacity and developmental ability of bovine oocytes by regulating cytoplasmic maturation events [J]. *J Pineal Res*, 2018, doi: 10.1111/jpi.12445.
- [44] GE H, TOLLNER T L, HU Z, et al. The importance of mitochondrial metabolic activity and mitochondrial DNA replication during oocyte maturation *in vitro* on oocyte quality and subsequent embryo developmental competence [J]. *Mol Reprod Dev*, 2012, 79(6): 392-401.
- [45] SONG C, PENG W, YIN S, et al. Melatonin improves age-induced fertility decline and attenuates ovarian mitochondrial oxidative stress in mice [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 35165.
- [46] OCHOA C D, WU R F, TERADA L S. ROS signaling and ER stress in cardiovascular disease [J]. *Mol Aspects Med*, 2018, 63: 18-29.
- [47] YANG Y, PEI X, JIN Y, et al. The roles of endoplasmic reticulum stress response in female mammalian reproduction [J]. *Cell Tissue Res*, 2016, 363(3): 589-97.
- [48] PARK H J, PARK J Y, KIM J W, et al. Melatonin improves the meiotic maturation of porcine oocytes by reducing endoplasmic reticulum stress during *in vitro* maturation [J]. *J Pineal Res*, 2018, doi: 10.1111/jpi.12458.
- [49] ZHANG M, DAI X, LU Y, et al. Melatonin protects oocyte quality from Bisphenol A-induced deterioration in the mouse [J]. *J Pineal Res*, 2017, doi: 10.1111/jpi.12396.
- [50] LAN M, HAN J, PAN M H, et al. Melatonin protects against defects induced by deoxynivalenol during mouse oocyte maturation [J]. *J Pineal Res*, 2018, 65(1): e12477.
- [51] LORD T, NIXON B, JONES K T, et al. Melatonin prevents post-ovulatory oocyte aging in the mouse and extends the window for optimal fertilization *in vitro* [J]. *Biol Reprod*, 2013, 88(3): 67.
- [52] YANG Q, DAI S, LUO X, et al. Melatonin attenuates postovulatory oocyte dysfunction by regulating SIRT1 expression [J]. *Reproduction*, 2018, 156(1): 81-92.
- [53] WANG T, GAO Y Y, CHEN L, et al. Melatonin prevents postovulatory oocyte aging and promotes subsequent embryonic development in the pig [J]. *Aging (Albany NY)*, 2017, 9(6): 1552-64.
- [54] BAKER T G. A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries [J]. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 1963, 158: 417-33.
- [55] SHEN M, JIANG Y, GUAN Z, et al. Protective mechanism of FSH against oxidative damage in mouse ovarian granulosa cells by repressing autophagy [J]. *Autophagy*, 2017, 13(8): 1364-85.
- [56] 王灿. 自噬机制与卵巢早衰的关系 [J]. 生殖与避孕(WANG C. Relationship between autophagy mechanism and premature ovarian failure [J]. *Reproduction and Contraception*), 2016, 36(8): 637-41.
- [57] SHEN M, CAO Y, JIANG Y, et al. Melatonin protects mouse granulosa cells against oxidative damage by inhibiting FOXO1-mediated autophagy: implication of an antioxidation-independent mechanism [J]. *Redox Biol*, 2018, 18: 138-57.
- [58] VOGT P K, JIANG H, AOKI M. Triple layer control: phosphorylation, acetylation and ubiquitination of FOXO proteins [J]. *Cell Cycle*, 2005, 4(7): 908-13.
- [59] LIU Z, CASTRILLON D H, ZHOU W, et al. FOXO1/3 depletion in granulosa cells alters follicle growth, death and regulation of pituitary FSH [J]. *Mol Endocrinol*, 2013, 27(2): 238-52.
- [60] KAJIHARA T, UCHINO S, SUZUKI M, et al. Increased ovarian follicle atresia in obese Zucker rats is associated with enhanced expression of the forkhead transcription factor FOXO1 [J]. *Med Mol Morphol*, 2009, 42(4): 216-21.
- [61] XU L, WANG W, ZHANG X, et al. Palmitic acid causes insulin resistance in granulosa cells via activation of JNK [J]. *J Mol Endocrinol*, 2019, 62(4): 197-206.
- [62] YANG H, XIE Y, YANG D, et al. Oxidative stress-induced apoptosis in granulosa cells involves JNK, p53 and Puma [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(15): 25310-22.
- [63] CAO Y, SHEN M, JIANG Y, et al. Melatonin reduces oxidative damage in mouse granulosa cells via restraining JNK-dependent

- autophagy [J]. *Reproduction*, 2018, 155(3): 307-19.
- [64] KUANG H, HAN D, XIE J, et al. Profiling of differentially expressed microRNAs in premature ovarian failure in an animal model [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2014, 30(1): 57-61.
- [65] TAMURA H, KAWAMOTO M, SATO S, et al. Long-term melatonin treatment delays ovarian aging [J]. *J Pineal Res*, 2017, doi: 10.1111/jpi.12381.
- [66] MA M, CHEN X Y, LI B, et al. Melatonin protects premature ovarian insufficiency induced by tripterygium glycosides: role of SIRT1 [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(4): 1580-602.
- [67] MEIROW D, BIEDERMAN H, ANDERSON R A, et al. Toxicity of chemotherapy and radiation on female reproduction [J]. *Clin Obstet Gynecol*, 2010, 53(4): 727-39.
- [68] BARBERINO R S, MENEZES V G, RIBEIRO A, et al. Melatonin protects against cisplatin-induced ovarian damage in mice via the MT1 receptor and antioxidant activity [J]. *Biol Reprod*, 2017, 96(6): 1244-55.
- [69] JANG H, LEE O H, LEE Y, et al. Melatonin prevents cisplatin-induced primordial follicle loss via suppression of PTEN/AKT/FOXO3a pathway activation in the mouse ovary [J]. *J Pineal Res*, 2016, 60(3): 336-47.
- [70] JANG H, NA Y, HONG K, et al. Synergistic effect of melatonin and ghrelin in preventing cisplatin-induced ovarian damage via regulation of FOXO3a phosphorylation and binding to the p27(Kip1) promoter in primordial follicles [J]. *J Pineal Res*, 2017, doi: 10.1111/jpi.12432.
- [71] AGARWAL A, APONTE-MELLADO A, PREMKUMAR B J, et al. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2012, 10: 49.