

AMPK信号通路在原始卵泡激活中的作用及机制的研究进展

陈思润¹ 李自梅¹ 董艳鹏¹ 王定越² 吴德¹ 徐盛玉^{1*}

(¹四川农业大学动物营养研究所, 动物抗病营养教育部重点实验室, 农业农村部动物抗病营养与饲料重点实验室, 动物抗病营养四川省重点实验室, 成都 611130; ²四川华德生物工程有限公司, 成都 610000)

摘要 原始卵泡的激活和发育是雌性动物具有生殖机能的起始, 原始卵泡转化为初级卵泡并进一步发育受到多种因子和多个信号通路的影响。研究表明, 腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)为卵泡发育的关键调控因子, 并且AMPK可通过哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路和河马(Hippo)信号通路调控原始卵泡的休眠和激活。该文主要综述了AMPK在卵泡发育中的作用, 及其介导mTOR信号通路和Hippo信号通路调控原始卵泡休眠或激活的作用及机制, 以便为更好地解决养殖生产中的繁殖障碍和生产力不高等问题提供理论支持。

关键词 AMPK; 原始卵泡激活; mTOR; Hippo; 信号通路

Research Progress on the Role and Mechanism of AMPK Signaling Pathway in Primordial Follicular Activation

CHEN Sirun¹, LI Zimei¹, DONG Yanpeng¹, WANG Dingyue², WU De¹, XU Shengyu^{1*}

(¹Institute of Animal Nutrition, Sichuan Agricultural University, Key Laboratory of Animal Resistance Nutrition, Ministry of Education, Key Laboratory of Animal Resistance Nutrition and Feed, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Sichuan Key Laboratory of Animal Resistance Nutrition, Chengdu 611130, China; ²Sichuan Rota Bioengineering Co., Ltd, Chengdu 610000, China)

Abstract The activation and development of primordial follicles is the beginning of reproductive function in female animals. Primordial follicles are transformed into primary follicles and their further development is affected by various factors and multiple signaling pathways. Studies have shown that AMPK (AMP-activated protein kinase) is a key regulator of follicular development, and AMPK can regulate the dormancy and activation of primitive follicles through the mTOR (mammalian target of rapamycin) and Hippo signaling pathways. This paper reviews the role of AMPK in follicular development and its role in mediating the mTOR and Hippo signaling pathways in the regulation of primordial follicular dormancy or activation, in order to provide theoretical support for better solving the problems of reproduction barriers and low productivity in livestock and poultry production.

Keywords AMPK; primordial follicular activation; mTOR; Hippo; signaling pathway

收稿日期: 2020-06-02 接受日期: 2020-08-07

四川省科技厅应用基础研究(批准号: 2019YJ0412)和十三五国家重点研发计划(优质高产种猪养殖标准化技术体系应用与示范)(批准号: 2018YFD0501005)资助的课题

*通讯作者。Tel: 18583661039, E-mail: shengyuxu@sicau.edu.cn

Received: June 2, 2020 Accepted: August 7, 2020

This work was supported by the Applied Basic Research of Sichuan Provincial Science and Technology Department (Grant No.2019YJ0412) and the China National Key R&D Program during the 13th Five-Year Plan Period (Grant No.2018YFD0501005)

*Corresponding author. Tel: +86-18583661039, E-mail: shengyuxu@sicau.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5409>

卵巢是雌性哺乳动物生殖机能中十分重要的实质性器官,而卵泡是卵巢中卵母细胞发生和发育的重要功能单位,也是雌性哺乳动物生殖的基本功能单位^[1]。原始卵泡由静止状态被激活转变为生长状态的过程为原始卵泡的激活,即原始卵泡向初级卵泡的转化^[2],继而发育为成熟卵泡后排出卵母细胞。原始卵泡激活为生长卵泡是雌性哺乳动物生殖的关键步骤,是各种因子和信号通路共同作用的结果。研究表明,腺苷活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)是一种哺乳动物细胞表达的高度保守的丝氨酸/苏氨酸激酶,主要调控细胞内的代谢和能量平衡,因其可调控ATP的合成和分解,故被称为细胞能量调节器^[3]。随着对其的深入研究发现,AMPK可通过调控河马(Hippo)信号通路和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路参与多种复杂的细胞过程,是调控哺乳动物繁殖性能的关键因子^[4]。本文主要对AMPK及其信号通路在原始卵泡激活中的作用及机制进行综述,以期为进一步研究提供理论参考,并为提高雌性哺乳动物繁殖性能提供重要理论依据。

1 原始卵泡激活

原始卵泡发育的启动又称卵泡生长发育的活化,是原始卵泡由静止状态转变为生长状态的过程,即原始卵泡向初级卵泡的转化^[2]。哺乳动物胎早期卵巢中,原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs)迁移进入生殖嵴,在生殖嵴中经历性腺分化、细胞生长和细胞器重排之后,逐步转化形成卵原细胞。卵原细胞再经过DNA复制、细线期、偶线期、粗线期之后,静止在双线期。大多数卵母细胞在胎早期被阻滞在减数第一次分裂前期的双线期,在一个时期达到最大值后开始大量死亡,而单个被阻滞的卵母细胞被前体颗粒细胞包围,相互连接后形成原始卵泡。

不同的物种原始卵泡的形成过程有一定的差异,雌性小鼠的PGCs大约在交配后10.5天迁移进入生殖嵴,开始增殖;约13.5天时开始减数分裂,之后被阻滞在双线期;约15.5天时卵母细胞数量达到最大值;约17.5天时合胞体破裂,大量的卵母细胞死亡,单个卵母细胞被前颗粒细胞包围连接后形成原始卵泡^[1,5]。而女性胎早期PGCs在大约妊娠5周后迁移入生殖嵴;约11周时被阻滞在双线期;约20周时卵母细

胞数量达到最大;约24周时合胞体破裂,卵母细胞大量死亡形成原始卵泡^[1]。猪胎儿期PGCs的增殖从妊娠第13天已经开始,妊娠18天时猪胚中肾边缘可观察到PGCs,妊娠21天时生殖嵴由表面上皮、原始性索和间充质三种组织构成,PGCs在妊娠47天时启动减数分裂,妊娠54天时,皮质中层出现合胞体样卵母细胞群,髓质相邻的皮质深层有一些原始卵泡正在形成,妊娠61天时,皮质中层出现大量合胞体样卵母细胞群,皮质深层出现了较多的原始卵泡^[6-8]。

动物性成熟后,一部分处于休眠期的原始卵泡被募集使其从阻滞状态转化为激活状态,开始从原始卵泡向初级卵泡转化。原始卵泡被激活发生如图1所示的变化:卵母细胞直径变大,扁平的原始颗粒细胞(primordial follicle granulosa cells, PFGCs)变成立方体的颗粒细胞,并且颗粒细胞增殖发育围绕在卵母细胞周围^[9],原始颗粒细胞来源于生殖嵴中进行有丝分裂增殖的PGCs周围的体细胞^[4]。原始卵泡的激活和发育受到环境、原始颗粒细胞的激活和分化、卵母细胞的激活和生长三个层面的相互调控,受到多种因子和多个信号通路影响^[1],而AMPK可调控卵巢发育,参与原始卵泡激活的调控,并且AMPK可介导多种信号通路参与原始卵泡激活^[10-13]。

2 AMPK的结构及主要功能

AMPK是一种哺乳动物细胞中表达的高度保守的丝氨酸/苏氨酸激酶,是由 α -亚基、 β -亚基和 γ -亚基组成的异源三聚体(图2),三个亚基比例为1:1:1^[15-16],AMPK由七个不同基因编码蛋白质亚基组成,包括两个 α 催化亚基基因($\alpha 1$ 、 $\alpha 2$),两个 β 亚基基因($\beta 1$ 、 $\beta 2$)和三个 γ 亚基基因($\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$),并且这些亚基在不同的组织中表达^[17]。 α -亚基为催化亚基,其N末端是一个传统的丝氨酸/苏氨酸激酶结构域,紧随其后的是一个自主抑制结构(auto-inhibitory domain, AID),AID与C末端是通过一个“接头肽”相连的; β -亚基C末端结构域连接 α -亚基的C末端结构域和 γ -亚基的N末端结构域,形成了AMPK复合物连接的中心点,靠近N末端含有碳水化合物结合部位,这使得AMPK能够与糖原结合; γ -亚基含有四个串联重复的胱硫醚- β -合成酶(cystathionine β -synthase, CBS)重复序列,为位点1、位点2、位点3和位点4,在哺乳动物中,位点1亚基和位点3可与ATP、ADP或AMP竞争性结合,位点4总是与AMP紧密结合,而位点2似乎总是空缺^[15]。

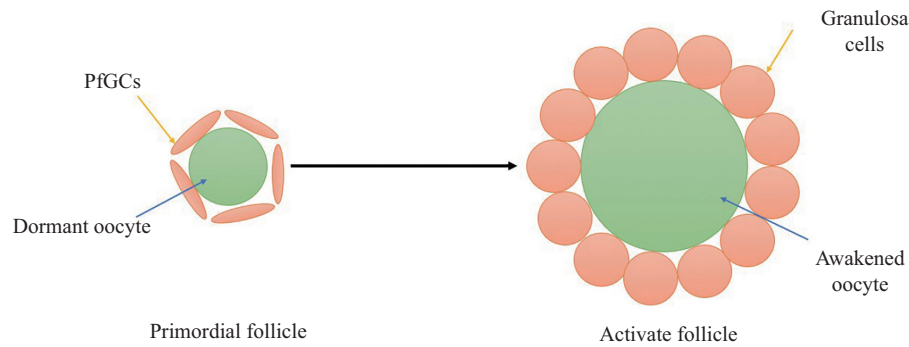
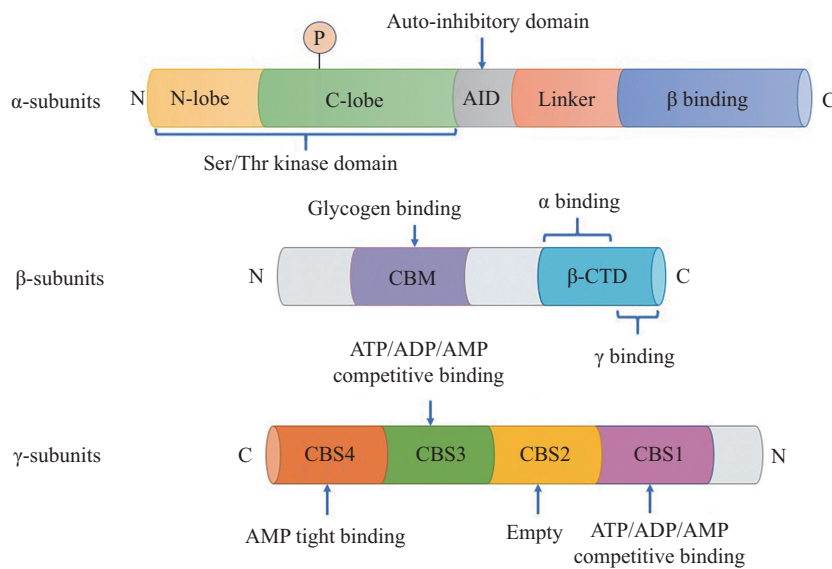


图1 原始卵泡激活图(根据参考文献[14]修改)

Fig.1 Primordial follicular activation (modified from the reference [14])



AID: 自主抑制结构; β -CTD: β 亚基羧基末端结构域; CBM: 碳水化合物结合部位; CBS: 胱硫醚- β -合成酶; C-lobe: 激酶结构域的C端叶; N-lobe: 激酶结构域的N端叶。

AID: auto-inhibitory domain; β -CTD: the β -subunit carboxy-terminal domain; CBM: carbohydrate-binding module; CBS: cystathionine β -synthase; C-lobe: C-terminal lobe of kinase domain; N-lobe: N-terminal lobe of kinase domain.

图2 哺乳动物AMPK结构图(根据参考文献[15]修改)

Fig.2 Structure of AMPK in mammals (modified from the reference [15])

AMPK的活性受到AMP/ATP或者ADP/ATP比值变化的调节,在基础能量状态下, γ -亚基中位点1和位点3与ATP结合,在中度能量应激状态下,ADP或AMP会率先取代 γ -亚基位点3的ATP,从而促使AMPK在Thr172位点的磷酸化,导致AMPK活性增强100倍^[18]。在更高强度能量应激状态下,位点1的ATP也被AMP取代,导致AMPK进一步的变构激活。随着能量状态恢复正常,位点1的AMP和位点3的ADP或AMP逐渐被ATP取代,这促进了Thr172的去磷酸化,使AMPK逐步恢复到基础状态^[15]。AMPK的活性也受到非ATP依赖途径的调节。瘦素和胃饥饿素^[15,19]、脂联素^[20]、高渗应激、肝激

酶B1(liver kinase B1, LKB1)、钙离子/钙调蛋白依赖性蛋白激酶的激酶 β (Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinase β , CaMKK β)和磷酸化转化生长因子 β 活化激酶1(TGF beta-activated kinase 1, TAK1)等AMPK上游激酶^[15],5-氨基咪唑-4-羧基-1- β -D-核苷(5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside, AICAR)^[21],化合物C(compound C)^[4]、二甲双胍^[22]、噻唑烷二酮类药物^[22]等因素都会导致AMPK的活性发生变化。

AMPK主要调控细胞内的代谢和维持能量平衡,调节哺乳动物全身新陈代谢。具体而言,活化的AMPK可增加葡萄糖和脂肪酸的摄入,增强葡萄

糖和脂肪酸的分解代谢提高其分解能力,并抑制其合成代谢。AMPK也可抑制蛋白质、核糖体和RNA合成中相关的酶或者蛋白质的活性,从而阻断其合成代谢^[23]。AMPK还可在胃饥饿素和瘦素两种激素的调控下,通过CaMKK β 途径激活突触神经元中的AMPK从而调节摄食^[15,19]。AMPK是肿瘤抑制因子LKB1的下游效应体,对于肿瘤发生的调节起着抑制和促进的双重作用^[23-24]。在繁殖性能方面,AMPK在卵巢和睾丸等生殖器官中发挥重要的调控作用^[25-26]。

3 AMPK在卵泡发育中的作用

AMPK可调控细胞内的代谢和维持能量平衡,并且AMPK在不同物种的卵母细胞、卵丘细胞、颗粒细胞和黄体中均有表达^[26],暗示AMPK可能是调控卵泡发育的关键因子。

有研究分离出未成熟的小鼠卵母细胞,在含有二丁酰环腺苷酸或次黄嘌呤的抑制培养基中培养,再通过添加AMPK激活剂(AICAR)诱导其减数分裂的作用,结果发现,添加AICAR组与对照组相比,生发泡破裂(germinal vesicle breakdown, GVBD)比率远远高于对照组;当AICAR浓度高于250 $\mu\text{mol/L}$ 时对单个卵母细胞GVBD出现起促进作用,当AICAR浓度升至1 000 $\mu\text{mol/L}$ 时,使得卵丘细胞包围的卵母细胞GVBD比率显著升高。表明AMPK激活剂可诱导小鼠卵母细胞的减数分裂作用,增加GVBD比率^[21]。可见,AMPK激活可诱导卵母细胞减数分裂,促进卵母细胞发育成熟。

另有研究表明,为同期发情后的母羊通过颈静脉置管注射相同剂量的生理盐水和葡萄糖,注射结束后收集卵巢进行检测,结果发现,注射葡萄糖组与注射生理盐水组相比,卵泡数量显著增加,颗粒细胞中AMPK磷酸化水平和磷酸化AMPK与总AMPK的比率均显著降低^[27]。另一研究中,从3天雌二醇诱导的未成熟大鼠的卵巢中提取颗粒细胞,置于不同浓度(0、45和90 ng/mL)的二氢睾酮(dihydrotestosterone, DHT)中培养24 h,结果显示,AMPK的磷酸化水平随着DHT浓度的增加而升高^[28]。此外,添加FSH(follicle-stimulating hormone)可抑制AMPK的磷酸化,促进颗粒细胞增殖,但DHT(90 ng/mL)预处理24 h可促进AMPK磷酸化,抑制颗粒细胞的增殖;并且使用AMPK激活剂AICAR可阻断FSH介导的

细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinase, ERK)的磷酸化;使用化合物C(一种AMPK抑制剂)可抑制AMPK的磷酸化提高细胞周期调节蛋白cyclin D2的表达^[29]。这表明,DHT的升高将导致AMPK的激活,从而抑制ERK的磷酸化。因此,AMPK的激活会抑制ERK的磷酸化,从而阻止颗粒细胞的有丝分裂。

综上所述,AMPK的激活可诱导卵母细胞减数分裂,促进卵母细胞的成熟,但是会阻止颗粒细胞的有丝分裂,抑制卵泡发育,减少卵泡数量。由此提示,动物中AMPK的激活存在一个窗口期,AMPK适时的激活可以既起到不减少卵泡数量,同时又促进动物的卵母细胞成熟的作用。

4 AMPK介导信号通路调控原始卵泡的激活

4.1 AMPK介导mTOR信号通路调控原始卵泡的激活

mTOR是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,可调控细胞生长和增殖。mTOR与多种蛋白质相互结合形成两种不同的复合物,即mTOR复合物1(mammalian target of rapamycin complex 1, mTORC1)和mTOR复合物2(mammalian target of rapamycin complex 2, mTORC2)^[30]。其中,mTORC1可控制翻译和抑制自噬作用,并调节缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达;mTORC2可调节肌动蛋白细胞骨架,并通过ser473的磷酸化激活蛋白激酶B(protein kinase B, PKB/AKT)^[31]。mTORC1的活性主要受受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinases, RTKs)信号通路的调节。细胞外配体作用于细胞膜表面RTKs,激活下游的AKT^[32]。AKT可间接稳定细胞周期蛋白D1和原癌基因*Myc*从而调节细胞周期^[31]。

TSC1和TSC2的异二聚体是mTORC1的重要传感器,其中,TSC1使TSC2保持结构稳定。TSC2中的GTPase激活蛋白(GTPase-activating protein, GAP)域抑制mTORC1的活性,TSC1或者TSC2突变失活或杂合性缺失都将导致结节性硬化症(tuberous sclerosis, TSC),这是一种以大量扩大细胞组成的良性肿瘤为特征的疾病,在TSC1或TSC2突变的细胞中,mTORC1具有结构活性^[33]。

蛋白激酶B的激活,使TSC2磷酸化,导致TSC2与TSC1分离,从而解除了TSC1-TSC2复合物对mTORC1的抑制作用,导致mTORC1激活。胰岛素样生长因子1(insulin like growth factor 1, IGF1)也可通过丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路解除TSC1-TSC2复合物对mTORC1的抑制^[32]。mTORC1的活化可激活下游分子核糖体S6蛋白激酶1(ribosomal S6 protein kinase 1, S6K1)及真核启动因子4E(eukaryotic initiation factor 4E, eIF4E),从而促进卵母细胞中蛋白翻译和核糖体生物发生,激活原始卵泡,促进卵泡的生长和发育。而TSC1-TSC2复合物抑制mTORC1活性,维持原始卵泡静止^[31]。

LU等^[11]通过卵巢体外培养,比较AMPK抑制剂化合物C处理的卵巢组织中各基因表达量的变化,及其在卵泡或血管发育上的区别。结果发现,与对照组相比,AMPK抑制剂(10 $\mu\text{mol/L}$, 1 h)处理10日龄小鼠卵巢,卵巢mTOR及其下游蛋白核糖体蛋白S6和真核翻译起始因子4B(eukaryotic initiation factor 4B, eIF4B)的磷酸化水平暂时升高,而TSC2的磷酸化水平在处理后将降低;AMPK抑制剂处理1 h至4 h后,与mTOR下游信号通路相关的HIF-1 α 及VEGFA的mRNA水平升高;AMPK抑制剂(10 $\mu\text{mol/L}$, 8 h)处理卵巢后,原始卵泡的数量降低,而初级和次级卵泡的数量增加,成熟卵母细胞的数量增加。表明AMPK抑制剂激活mTOR信号通路,增加HIF-1 α 和VEGFA的表达,促进原始卵泡的激活和生长,进而促进卵巢生长和血管的发育。综上,AMPK的抑制使TSC2失活,促进mTOR下游蛋白S6和eIF4B的磷酸化,提高HIF-1 α 和VEGFA的mRNA表达水平。

本课题组前期研究中,对3日龄SPF级雌性昆明小鼠卵巢进行体外培养,通过添加AMPK激活剂AICAR或抑制剂化合物C处理体外培养卵巢,结果发现,与对照组相比,AMPK激活剂(1 mmol/L)处理的卵巢中原始卵泡比例升高,而初级卵泡比例和初级卵泡/原始卵泡降低;AMPK激活剂(2 mmol/L, 4 h)处理的卵巢中p-AMPK/AMPK增加,而p-mTOR/mTOR和p-S6/S6降低。表明AMPK激活剂AICAR通过激活AMPK降低mTOR磷酸化,抑制下游S6蛋白磷酸化,并抑制原始卵泡激活。AMPK抑制剂(10 $\mu\text{mol/L}$)处理的卵巢中,原始卵泡比例低于对照组,初级卵泡比例、初级卵泡/原始卵泡高于对照组;AMPK抑制剂(20 $\mu\text{mol/L}$, 6 h)处理的卵

巢,p-AMPK/AMPK降低,而p-mTOR/mTOR和p-S6/S6升高。表明AMPK抑制剂化合物C抑制AMPK活性,促进mTOR及下游蛋白S6的磷酸化,进而促进原始卵泡的激活^[4]。在新生鼠上的研究发现,新生4天雌鼠饥饿处理24 h(低血糖,卵泡生长从原始到初级和次级阶段不依赖于垂体促性腺激素^[34-36]),原始卵泡比例高于正常哺乳的新生雌鼠,而初级卵泡比例、初级卵泡/原始卵泡低于正常哺乳的新生雌鼠;卵巢p-mTOR/mTOR和p-S6/S6降低^[4]。表明在活体动物中,葡萄糖可通过mTOR信号途径影响体内卵巢原始卵泡激活。综上所述,葡萄糖可通过AMPK/mTOR信号途径影响原始卵泡激活。

综上所述,AMPK的抑制可导致TSC2失活,使mTOR活化,进一步促进下游分子S6K1及真核翻译起始因子激活,从而促进卵母细胞的蛋白翻译和核糖体生物发生,激活原始卵泡,促进卵泡的生长和发育;并且提高HIF-1 α 和VEGFA的mRNA水平,促进卵巢的生长和血管的发育。AMPK的活化致使TSC1-TSC2复合物抑制mTOR的活性,维持原始卵泡的静止。此外,葡萄糖可通过AMPK/mTOR信号途径调控原始卵泡激活。

4.2 AMPK介导Hippo信号通路调控原始卵泡的激活

Hippo通路是细胞增殖的负性调控通路,其可调节细胞再生、增殖及凋亡,调控器官大小,具有高度的保守性^[37]。在生殖系统中,它在果蝇和雌性哺乳动物生殖器发育中都发挥着重要作用^[38-39]。最初在果蝇中发现的Hippo途径包括两种蛋白激酶:Hippo和Warts,它们串联在一起限制转录辅激活物Yorkie的活性。在哺乳动物细胞中,该途径相对复杂,相应的每个成分都包含两个同源物:Hippo同源物包含哺乳动物STE20样激酶1和2(mammalian sterile 20-like kinase 1和2, MST1和MST2);Warts同源物包含大肿瘤抑制因子1和2(large tumor suppresser homolog1和2, LATS1和LATS2);Yorkie同源物包含yes关联蛋白(yes associated protein, YAP)和具有PDZ结合基序的转录共激活因子(transcriptional co-activator with PDZ-binding motif, TAZ)^[40]。这些成分被认为是一个不断扩大的蛋白质集合的一部分,统称为Hippo途径^[12,41-42]。

哺乳动物中,MST1/2激酶与磷酸化适配器蛋白WW45组成复合蛋白,激活并磷酸化LATS1/2激酶,

LATS1/2激酶也可被另一个蛋白MOB(Mps One Binder kinase activator)激活, 激活的LATS1/2激酶直接磷酸化转录辅助因子YAP的Ser127位点^[43-44]。YAP/TAZ本身不能与DNA结合, 但它可以与序列特异性DNA结合蛋白形成复合物, 特别是转录增强缔合域(TEA domain transcription factor, TEAD)家族, 这种复合物可促进细胞生长和增殖以及抑制细胞凋亡基因的表达, 细胞则表现为增殖过度、凋亡抑制^[12]。YAP/TAZ与血管生成素家族蛋白AMOT(angiomotin)、AMOTL1(angiomotin like protein 1)和AMOTL2(angiomotin like protein 2)的结合在细胞质中隔离YAP/TAZ, 并促进其泛素化和LATS对YAP/TAZ的Ser127的磷酸化^[45]。这种磷酸化促进了YAP/TAZ与14-3-3蛋白的稳定结合, 从而使YAP/TAZ滞留在细胞质中^[46], 导致其被排除在细胞核, 使得下游细胞周期蛋白cyclin E等与增殖相关的基因无法表达, 从而阻碍细胞生长^[47]。

研究表明, Hippo信号通路中MST、LATS和YAP存在于小鼠卵巢细胞中, 并且与小鼠卵巢原始卵泡池的大小具有时序相关性^[48-49]。在一项培养小鼠卵巢的研究报告中发现, *LATS1*缺失增加了生殖细胞凋亡, 并导致原始卵泡和激活卵泡数量显著减少^[50]。

HU等^[13]建立小鼠原始卵泡体外培养模型, 检测3日龄小鼠卵巢体外培养8天后Hippo通路主要组分及表达变化, 发现3日龄时和培养8天后的小鼠卵巢Hippo信号通路中MST1、p-MST、LATS2、YAP1和p-YAP1均有表达。与3日龄时相比, 小鼠卵巢培养8天后, MST1、p-MST、LATS2的表达量均显著减少; YAP1、p-YAP1蛋白表达显著增加; p-MST/MST1、p-YAP1/YAP1比值显著减少。通过构建*YAP1*基因慢病毒载体, 发现利用慢病毒载体可调节YAP1的表达量, 并且发现卵泡数量有显著的变化。通过*YAP1*基因敲除, 发现原始卵泡数量显著增加, 而初级卵泡数量减少。综上所述, Hippo信号途径与原始卵泡的激活密切相关, 并且YAP1的活性改变将显著影响原始卵泡的激活过程。

另有研究表明, 能量压力(低葡萄糖)通过AMPK和LATS的多种机制抑制YAP活性^[12,46,51-52]: AMPK磷酸化AMOTL1蛋白, 使其更稳定, 然后AMOTL1促进LATS在Ser127上磷酸化YAP, 从而增强YAP与14-3-3蛋白的结合, 促进其从细胞核中排除; AMPK使YAP在Ser94磷酸化, 从而破坏其与TEAD的相互作用, 使其无法正常转录; AMPK使YAP在Ser61磷酸化, 降低

YAP转录激活能力。这三种途径均可降低YAP的表达, 导致下游与增殖相关的基因无法表达, 从而阻碍细胞生长。

LU等^[11]将10日龄小鼠卵巢进行体外培养, 利用AMPK抑制剂化合物C处理卵巢组织后对YAP及其下游通路中结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)进行检测, 发现与对照组相比, AMPK抑制剂(10 μmol/L, 1 h)处理后, 卵巢切片的免疫荧光染色结果显示, 定位于细胞核中的YAP数量显著增加; 并且AMPK抑制剂处理1 h至4 h后, CTGF的mRNA水平升高。CTGF是一种细胞蛋白, 在细胞黏附、迁移、增殖、血管生成等过程中发挥重要作用^[53-55]。有研究已经证实, Hippo信号通路中CTGF的增加促进卵巢细胞的生长、存活和增殖^[56], 并且有研究表明, AMPK的激活降低了YAP依赖性CTGF的表达^[46,51]。综上, AMPK的抑制导致YAP定位于细胞核, 促进CTGF表达, 进而可刺激原始卵泡的激活和生长, 促进卵巢的生长和血管的发育。

本课题组通过体外培养3日龄SPF级雌性昆明小鼠卵巢研究发现, AMPK激活剂AICAR(2 mmol/L, 4 h)处理的小鼠卵巢p-AMPK/AMPK显著增加, p-LATS1/LATS1极显著增加, 而p-YAP(Ser127)/YAP显著降低; AMPK抑制剂化合物C(20 μmol/L, 6 h)处理卵巢后p-AMPK/AMPK极显著降低, 但p-LATS1/LATS1和p-YAP(Ser127)/YAP差异不显著^[9]。这一结果与上述研究得出的AMPK抑制促进YAP定位于细胞核结论不一致。推测可能是由于AMPK过度激活YAP而引起一种负反馈调节机制, 从而防止YAP过度磷酸化。

综合上述研究表明, AMPK活性升高可调控YAP不同位点的磷酸化从而降低YAP的表达; Hippo信号通路中YAP表达量的下降可显著影响原始卵泡的激活过程。但AMPK介导Hippo信号通路调节原始卵泡激活的条件及在不同物种中的作用机制还有待进一步研究。

5 小结

综上, 原始卵泡激活是雌性哺乳动物生殖的关键步骤, 直接影响着雌性哺乳动物的繁殖性能。AMPK是调控卵泡发育的关键因子。抑制或激活AMPK都将导致mTOR信号通路的活性发生改变, 使原始卵泡激活或保持静止。而AMPK介导Hippo信号通路影响原始卵泡激活的机制还有待继续研

究。对原始卵泡激活过程以及AMPK信号通路对原始卵泡调控的认识, 启示我们需要更加深入地了解这些影响因素, 以便为更好地解决养殖生产中的繁殖障碍和生产力不高等问题提供理论支持。

参考文献 (References)

- [1] 张华, 代燕丽, 张佳伟. 原始卵泡的激活与临床应用[J]. 山东大学学报(医学版)(ZHANG H, DAI Y L, ZHANG J W. Activation and clinical application of primitive follicles [J]. J Shandong Univ Health Sci), 2018, 56(4): 8-17.
- [2] 李轲涵. 原始卵泡发育启动的影响因素[J]. 畜牧与饲料科学(LI K H. Factors affecting primordial follicular development [J]. Anim Husb Feed Sci), 2007, 27(3): 62-5.
- [3] 王红丽, 马远方, 宋伦. 腺苷酸活化蛋白激酶参与调控物质代谢及多种病理反应的分子机制[J]. 生物技术通讯(WANG H L, MA Y F, SONG L. Molecular mechanism of AMPK in the regulation of substance metabolism and various pathological reactions [J]. Lett Biotechnol), 2015, 26(1): 119-23.
- [4] XU S Y, WU X L, DONG Y P, et al. Glucose activates the primordial follicle through the AMPK/mTOR signaling pathway [J]. Clin Transl Med, 2020, doi: 10.1002/ctm2.122.
- [5] GRIVE K J, FREIMAN R N. The developmental origins of the mammalian ovarian reserve [J]. Development, 2015, 142(15): 2554-63.
- [6] 许蒙蒙, 车龙, 徐盛玉, 等. 哺乳动物原始卵泡的形成和发育及影响因素[J]. 畜牧兽医学报(XU M M, CHE L, XU S Y, et al. Formation and development of mammalian primordial follicles and their influencing factors [J]. Acta Vet Et Zootech Sin), 2015, 46(1): 20-5.
- [7] 成志军, 陶勇, 章孝荣. 胎猪卵巢发生过程中的组织学变化[J]. 细胞生物学杂志(CHENG Z J, TAO Y, ZHANG X R. Histological changes in the development of fetal pig ovaries [J]. Chin J Cell Biol), 2008, 30(3): 352-6.
- [8] 成志军, 陶勇, 徐伟, 等. 早期猪胎儿卵巢的组织学观察[J]. 畜牧兽医学报(CHENG Z J, TAO Y, XU W, et al. Histological observation of the ovaries of early pig fetuses [J]. Acta Vet Et Zootech Sin), 2009, 40(1): 32-7.
- [9] 宋艳画, 宋善道, 张家骅. 原始卵泡形成和发育调节机制研究进展[J]. 动物医学进展(SONG Y H, SONG S D, ZHANG J H. Advances in the regulation of primordial follicular formation and development [J]. Adv Vet Med), 2006, 27(3): 30-3.
- [10] 许蒙蒙, 车龙, 张攀, 等. 腺苷酸活化蛋白激酶在哺乳动物卵巢发育中的调控作用及其机制[J]. 动物营养学报(XU M M, CHE L, ZHANG P, et al. The regulatory role of AMPK in mammalian ovarian development and its mechanism [J]. Acta Zoonutr Sin), 2015, 27(10): 3006-11.
- [11] LU X, GUO S, CHENG Y, et al. Stimulation of ovarian follicle growth after AMPK inhibition [J]. Reproduction, 2017, 153(5): 683-94.
- [12] HARIHARAN I K. Energy stress tames the Hippo pathway [J]. Nat Cell Biol, 2015, 17(4): 362-3.
- [13] 胡燎燎. HIPPO信号通路在小鼠原始卵泡启动中的作用及调控机制[D]. 南昌: 南昌大学, 2016.
- [14] ZHANG H, RISAL S, GORRE N, et al. Somatic cells initiate primordial follicle activation and govern the development of dormant oocytes in mice [J]. Curr Biol, 2014, 24(21): 2501-8.
- [15] HARDIE D G, ROSS F A, HAWLEY S A. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012, 13(4): 251-62.
- [16] 张新颖, 毛景东, 杨晓燕, 等. AMPK/mTOR信号通路的研究进展[J]. 微生物学杂志(ZHANG X Y, MAO J D, YANG X Y, et al. Research progress of AMPK/mTOR signaling pathway [J]. J Microbiol), 2019, 39(3): 109-16.
- [17] FAUBERT B, BOILY G, IZREIG S, et al. AMPK is a negative regulator of the Warburg effect and suppresses tumor growth *in vivo* [J]. Cell Metab, 2013, 17(1): 113-24.
- [18] 罗凌云. AMPK活化对肿瘤生物学行为和抗肿瘤治疗的作用[D]. 南昌: 南昌大学, 2016.
- [19] YANG Y, ATASOY D, SU H H, et al. Hunger states switch a flip-flop memory circuit via a synaptic AMPK-dependent positive feedback loop [J]. Cell, 2011, 146(6): 992-1003.
- [20] REI S, NORIYUKI O, SHINJI K, et al. Adiponectin stimulates angiogenesis in response to tissue ischemia through stimulation of amp-activated protein kinase signaling [J]. J Biol Chem, 2004, 279(27): 28670-4.
- [21] DOWNS S M, HUDSON E R, HARDIE D G. A potential role for AMP-activated protein kinase in meiotic induction in mouse oocytes [J]. Dev Biol, 2002, 245(1): 200-12.
- [22] 程媛. 脂联素通过LKB1途径激活骨骼肌腺苷酸活化蛋白激酶[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2010.
- [23] 许梦川, 吴跃峰, 李东明. AMPK的功能调控及其与肿瘤之间的关系[J]. 生理科学进展(XU M C, WU Y F, LI D M. Functional regulation of AMPK and its relationship with tumor [J]. Prog Physiol Sci), 2018, 49(1): 61-4.
- [24] FAUBERT B, VINCENT E E, POFFENBERGER M C, et al. The AMP-activated protein kinase (AMPK) and cancer: many faces of a metabolic regulator [J]. Cancer Lett, 2015, 356(2): 165-70.
- [25] 段鹏, 全超, 黄文婷, 等. PI3K-Akt/LKB1-AMPK-mTOR-p70S6K/4EBP1信号通路参与调节睾丸发育和精子发生的研究进展[J]. 中华男科学杂志(DUAN P, QUAN C, HUANG W T. Research progress of PI3K-Akt/LKB1-AMPK-mTOR-p70S6K/4EBP1 signaling pathway involved in regulating testicular development and spermatogenesis [J]. Natl J Androl), 2016, 22(11): 1016-20.
- [26] DUPONT J, REVERCHON M, CLOIX L, et al. Involvement of adipokines, AMPK, PI3K and the PPAR signaling pathways in ovarian follicle development and cancer [J]. Int J Dev Biol, 2012, 56(10/12): 959-67.
- [27] GALLET C, DUPONT J, CAMPBELL B K, et al. The infusion of glucose in ewes during the luteal phase increases the number of follicles but reduces oestradiol production and some correlates of metabolic function in the large follicles [J]. Anim Reprod Sci, 2011, 127(3/4): 154-63.
- [28] KAYAMPILLY P P, MENON K M J. AMPK activation by dihydrotestosterone reduces FSH-stimulated cell proliferation in rat granulosa cells by inhibiting ERK signaling pathway [J]. Endocrinology, 2012, 153(6): 2831-8.
- [29] KAYAMPILLY P P, MENON K M J. Follicle-stimulating hormone inhibits adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase activation and promotes cell proliferation of primary granulosa cells in culture through an Akt-dependent pathway [J]. Endocrinology, 2009, 150(2): 929-35.

- [30] 崔梦竹, 姜晓峰, 梁红艳. 氨基酸通过mTORC1通路调节自噬的研究进展[J]. 中国实验诊断学(CUI M Z, JIANG X F, LIANG H Y. Advances in the regulation of autophagy by amino acids through the mTORC1 pathway [J]. Chin J Lab Diagn), 2019, 23(6): 1094-7.
- [31] MAKKER A, GOEL M M, MAHDI A A. PI3K/PTEN/Akt and TSC/mTOR signaling pathways, ovarian dysfunction, and infertility: an update [J]. J Mol Endocrinol, 2014, 53(3): R103-18.
- [32] 朱静, 杨庆岭, 孙莹璞. mTOR与卵泡发育[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志(ZHU J, YANG Q L, SUN Y P. mTOR and follicular development [J]. J Int Reprod Health/Family Planing), 2019, 38(2): 150-3.
- [33] ADHIKARI D, LIU K. mTOR signaling in the control of activation of primordial follicles [J]. Cell Cycle, 2010, 9(9): 1673-4.
- [34] MCGEE E A, HSUEH A J. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles [J]. Endocr Rev, 2000, 21(2): 200-14.
- [35] RICHARDS J S, PANGAS S A. The ovary: basic biology and clinical implications [J]. J Clin Invest, 2010, 120(4): 963-72.
- [36] MCLAUGHLIN E A, MCIVER S C. Awakening the oocyte: controlling primordial follicle development [J]. Reproduction, 2009, 137(1): 1-11.
- [37] BARZEGARI A, GUEGUEN V, OMIDI Y, et al. The role of Hippo signaling pathway and mechanotransduction in tuning embryoid body formation and differentiation [J]. J Cell Physiol, 2020, 235(6): 5072-83.
- [38] HUANG J, KALDERON D. Coupling of Hedgehog and Hippo pathways promotes stem cell maintenance by stimulating proliferation [J]. J Cell Biol, 2014, 205(3): 325-38.
- [39] LIN T H, YEH T H, WANG T W, et al. The Hippo pathway controls border cell migration through distinct mechanisms in outer border cells and polar cells of the drosophila ovary [J]. Genetics, 2014, 198(3): 1087-99.
- [40] 张歆缘, 王斌, 于晖, 等. Hippo信号通路在骨代谢中的研究进展[J]. 国际口腔医学杂志(ZHANG X Y, WANG B, YU H, et al. Research progress of Hippo signaling pathway in bone metabolism [J]. Int J Stom), 2019, 46(3): 263-9.
- [41] SANTINON G, POCATERRA A, DUPONT S. Control of YAP/TAZ activity by metabolic and nutrient-sensing pathways [J]. Trends Cell Biol, 2016, 26(4): 289-99.
- [42] ZHAO B, LI L, LEI Q, et al. The Hippo-YAP pathway in organ size control and tumorigenesis: an updated version [J]. Genes Dev, 2010, 24(9): 862-74.
- [43] 吕智超. Hippo/MST信号通路核心因子在鸡前等级卵泡发育中的作用及分子机制[D]. 长春: 吉林农业大学, 2016.
- [44] 朱楚. 去泛素化酶USP9X通过稳定Hippo通路关键激酶LATS2蛋白水平发挥抑癌功能[D]. 杭州: 浙江大学, 2018.
- [45] 代晓明. AMOT家族蛋白在Hippo信号通路中的功能和分子机制研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2017.
- [46] MO J S, MENG Z, KIM Y C, et al. Cellular energy stress induces AMPK-mediated regulation of YAP and the Hippo pathway [J]. Nat Cell Biol, 2015, 17(4): 500-10.
- [47] SCHLEGELMILCH K, MOHSENI M, KIRAK O, et al. Yap1 acts downstream of alpha-catenin to control epidermal proliferation [J]. Cell, 2011, 144(5): 782-95.
- [48] XIANG C, LI J, HU L, et al. Hippo signaling pathway reveals a spatio-temporal correlation with the size of primordial follicle pool in mice [J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 35(3): 957-68.
- [49] 向晟. Hippo通路主要组分与小鼠原始卵泡池大小的时序相关性研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2014.
- [50] SUN T, PEPLING M E, DIAZ F J. Lats1 deletion causes increased germ cell apoptosis and follicular cysts in mouse ovaries [J]. Biol Reprod, 2015, 93(1): 22.
- [51] DERAN M, YANG J, SHEN C H, et al. Energy stress regulates hippo-YAP signaling involving AMPK-mediated regulation of angiotensin-like 1 protein [J]. Cell Rep, 2014, 9(2): 495-503.
- [52] WANG W, XIAO Z D, LI X, et al. AMPK modulates Hippo pathway activity to regulate energy homeostasis [J]. Nat Cell Biol, 2015, 17(4): 490-9.
- [53] HALL-GLENN F, LYONS K M. Roles for CCN2 in normal physiological processes [J]. Cell Mol Life Sci, 2011, 68(19): 3209-17.
- [54] JUN J I, LAU L F. Taking aim at the extracellular matrix: CCN proteins as emerging therapeutic targets [J]. Nat Rev Drug Discov, 2011, 10(12): 945-63.
- [55] KUBOTA S, TAKIGAWA M. The role of CCN2 in cartilage and bone development [J]. J Cell Commun Signal, 2011, 5(3): 209-17.
- [56] KAWAMURA K, CHENG Y, SUZUKI N, et al. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(43): 17474-9.