

# 巨噬细胞在卵泡发育和排卵过程中的作用

赵久华<sup>1,2</sup> 龚丽<sup>1</sup> 林凤屏<sup>1</sup> 王正朝<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>福建师范大学生命科学学院, 福建省发育与神经生物学重点实验室, 福州 350007; <sup>2</sup>皖西卫生职业学院, 六安 237005)

**摘要** 在哺乳动物中, 巨噬细胞是一种多功能细胞, 大量存在于生殖组织中, 在免疫反应中起关键作用。卵巢中的巨噬细胞可以通过表面受体的表达来鉴定, 在不同发情周期阶段的特殊定位和分布变化表明巨噬细胞在卵巢卵泡发育、排卵和黄体形成及退化时的组织重构中具有不同的作用。同时, 巨噬细胞参与卵泡发育及其排卵过程, 如吞噬和降解外来抗原, 基质溶解和组织重塑, 细胞因子、趋化因子和生长因子的产生和分泌。因此, 在先前研究基础上, 该文综述了哺乳动物卵巢巨噬细胞的功能及其在卵泡发育与排卵过程中的作用, 初步分析了巨噬细胞在卵巢疾病中的作用, 旨在进一步理解哺乳动物卵巢生物学的内容, 并为多囊卵巢综合征和卵巢早衰等卵巢疾病进行早期诊断和治疗提供重要参考资料。

**关键词** 巨噬细胞; 卵泡发育; 排卵; 卵巢早衰; 多囊卵巢综合征

## Effects of Macrophages on the Follicular Development and Ovulation

ZHAO Jiuhua<sup>1,2</sup>, GONG Li<sup>1</sup>, LIN Fengping<sup>1</sup>, WANG Zhengchao<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Provincial Key Laboratory for Developmental Biology and Neurosciences, College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China; <sup>2</sup>West Anhui Health Vocational College, Liuan 237005, China)

**Abstract** In mammals, macrophages are a kind of multifunctional cells, which are abundant in the reproductive tissues and play a key role in immune response. Macrophages in the ovary can be identified by their surface receptors expression. Their special localization and distribution changes in the ovary at different stages of the estrus cycle indicate that macrophages have different roles in ovarian follicular development, ovulation and tissue remodeling during luteal formation and degeneration. Macrophages participate in follicular development and ovulation, such as phagocytosis and degradation of foreign antigens, matrix dissolution and tissue remodeling, production and secretion of cytokines, chemokines and growth factors. Therefore, on the basis of previous studies, this paper reviews the function of mammalian ovarian macrophages and their role in the process of follicular development and ovulation, and preliminarily analyzes the role of these macrophages in ovarian diseases. It is helpful to further understand the biological content of mammalian ovary, and provide important reference materials for the early diagnosis and treatment for ovarian diseases, such as polycystic ovary syndrome and premature ovarian failure.

**Keywords** macrophage; follicular development; ovulation; premature ovarian failure; polycystic ovary syndrome

收稿日期: 2020-08-23 接受日期: 2020-09-08

福建省自然科学基金(批准号: 2018J01722, 2020J01176)、安徽省教育厅高校优秀青年骨干人才项目(批准号: GXGNFX2019120)、福建师范大学大学生创新创业项目(批准号: I202003009)和福建师范大学大学生创新创业项目(批准号: CXXL2020291)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0591-22868200, E-mail: zcwang@fjnu.edu.cn

Received: August 23, 2020 Accepted: September 8, 2020

This work was supported by Fujian Provincial Natural Science Foundation (Grant No.2018J01722, 2020J01176), Research Program of Excellent Young Talents in Colleges and Universities of Anhui Provincial Education Department (Grant No.GXGNFX2019120), Project of Innovation and Entrepreneurship of Fujian Normal University (Grant No.I202003009) and Project of Innovation and Entrepreneurship for Undergraduates of Fujian Normal University (Grant No.CXXL2020291)

\*Corresponding author. Tel: +86-591-22868200, E-mail: zcwang@fjnu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5417>

巨噬细胞是机体普遍存在的免疫细胞, 来源于骨髓的免疫前体细胞, 成熟后以单核细胞的形式进入血液, 在先天免疫和后天免疫中起着重要作用。除了保护机体免受外来生物和抗原的侵害外, 它们还可以通过执行多种功能活动的的能力维持组织内稳态, 包括吞噬和降解外来抗原, 基质溶解和组织重塑, 以及生长因子、细胞因子和趋化因子的产生和分泌<sup>[1-5]</sup>。巨噬细胞通过这些效应器的功能参与调节局部免疫和炎症反应, 从而影响正常的组织功能。

免疫细胞进入组织通常分为三步, 首先是通过白细胞上的选择素(L-选择素)和内皮细胞(E-和P-选择素)之间的相互作用, 使白细胞在内皮细胞上缓慢滚动。其次是细胞因子和趋化因子激活单核细胞, 并刺激细胞表面产生整合素, 如巨噬细胞1抗原(macrophage 1 antigen, Mac1)和淋巴细胞功能相关抗原-1(lymphocyte function associated antigen-1, LFA-1)。最后是这些白细胞整合素和内皮细胞黏附分子之间的相互作用, 介导单核细胞的牢固黏附, 使它们在内皮细胞之间迁移, 并进入组织<sup>[6]</sup>。在组织内, 单核细胞向巨噬细胞的分化发生在对周围微环境的反应中, 从而获得组织特异性表型。例如, 通过浸润单核细胞最初暴露的细胞因子可以决定成熟巨噬细胞的功能表型, 同时细胞外基质(extracellular matrix, ECM)也可以调节巨噬细胞功能<sup>[7]</sup>。

在雌性生殖系统中, 巨噬细胞不仅有助于调节垂体-性腺轴, 还广泛存在于雌性生殖组织中, 如卵巢、子宫、输卵管和乳腺<sup>[3-5]</sup>。在哺乳动物卵巢中, 在发情周期的不同阶段巨噬细胞的数量不同, 且具有不同的生理功能。本文在先前的研究基础上<sup>[8-18]</sup>, 对巨噬细胞及其衍生产物在卵巢卵泡发育及其排卵过程中的作用进行详述, 并阐明其在卵巢疾病中的作用, 旨在为进一步了解卵巢生物学功能, 为临床治疗相关的卵巢疾病提供重要的参考。

## 1 卵巢巨噬细胞的鉴定

组织中的巨噬细胞可以通过其表达的特定蛋白标记物来鉴定, 这些标记物主要是细胞表面受体。目前认为仅限于巨噬细胞的蛋白质是F4/80[人同源物是含EGF样组件黏蛋白样激素受体样1, EGF-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like 1, EMR1)和CD68(在人中被称为巨噬蛋白)]<sup>[19-20]</sup>。虽然F4/80的功能尚不完全清楚, 但已被广泛用作鉴

定许多组织中巨噬细胞的标记物。在小鼠卵巢中, F4/80阳性细胞从新生到出生后的分布发生了显著变化, 且在卵泡内膜、基质和黄体中均有发现<sup>[2]</sup>。CD68是一种公认的巨噬细胞内标记物, 被广泛应用于小鼠和人卵巢的免疫组织化学研究, 且主要定位于卵巢的血管结缔组织和黄体中<sup>[5]</sup>。另一个被广泛使用的标记物是II类MHC, 它参与巨噬细胞的抗原呈递。II类MHC阳性巨噬细胞已在排卵期的卵巢中发现, 尤其是黄体<sup>[19]</sup>。参与吞噬作用的受体也被用作巨噬细胞标记物, 包括Fc受体、补体受体、甘露糖受体、唾液凝集素和清道夫受体<sup>[20]</sup>。其中, 补体受体3(Mac1/CD11b)参与细胞-细胞和细胞-基质的黏附, 并且在排卵后小鼠卵巢卵泡内膜层和基质内以及黄体内发现了CD11b阳性细胞<sup>[3-4]</sup>。另外, 巨噬细胞的标记蛋白可揭示细胞功能特异性变化。例如, 兔黄体溶解与清道夫受体阳性巨噬细胞的增加相关, 随后CD68阳性巨噬细胞开始募集<sup>[2,5]</sup>。

## 2 卵巢巨噬细胞的功能

在哺乳动物卵巢中, 巨噬细胞的主要功能包括吞噬细胞碎片并呈现抗原, 分泌细胞因子、趋化因子和生长因子, 以及产生介导基质溶解的蛋白酶。因此, 巨噬细胞参与了卵巢的生理活动及其功能调节, 如卵巢卵泡的发育及其排卵过程。

### 2.1 吞噬和抗原呈递

巨噬细胞被认为是“专业的吞噬细胞”, 由于它们能表达特异性的细胞表面受体, 因此能比其他细胞更快、更有效地吸收微粒<sup>[21-24]</sup>。吞噬作用是一个复杂的过程, 包括巨噬细胞表面受体识别抗原, 启动肌动蛋白聚合并将外来分子或有机体内化为吞噬体。吞噬作用之后是吞噬体与溶酶体融合并降解颗粒<sup>[23]</sup>。巨噬细胞吞噬内源性和外源性物质, 如细胞碎片、细菌和病毒, 在培养过程中甚至吞噬乳胶珠。然而, 当使用外源性颗粒来观察吞噬作用时, 发现卵巢巨噬细胞的吞噬能力明显低于其他组织的巨噬细胞<sup>[25]</sup>。因此, 在组织重塑的特定阶段, 卵巢巨噬细胞可能主要利用吞噬作用清除凋亡细胞, 而不是清除外来碎屑。巨噬细胞在体内识别并内化凋亡和坏死细胞, 从而有效地清除这些细胞, 在豚鼠、小鼠和人卵巢中, 巨噬细胞吞噬闭锁的颗粒细胞和凋亡的黄体细胞, 从而导致卵泡闭锁和黄体溶解<sup>[21]</sup>。

在吞噬外来抗原后, 巨噬细胞能够在细胞内降

解并在细胞表面呈现与II类MHC相关的肽段。这些II类MHC抗原复合体通过T细胞受体CD3和CD4被辅助T细胞识别, 激活T细胞和抗原呈递巨噬细胞, 并引发快速免疫反应<sup>[23]</sup>。在大鼠和人卵巢以及马黄体中发现了II类MHC阳性细胞, 且在黄体晚期II类MHC抗原的染色增强, 同时发生T细胞侵袭<sup>[2]</sup>。黄体中存在大量II类MHC阳性细胞, 卵泡内膜内存在辅助性和抑制性T细胞<sup>[5]</sup>, 表明这些免疫细胞在黄体功能调节中发挥重要作用。

## 2.2 分泌细胞因子、趋化因子和生长因子

巨噬细胞是主要的分泌细胞, 能够释放细胞因子、趋化因子和生长因子, 在大多数组织的生理、病理过程中发挥作用<sup>[21]</sup>。一般来说, 这些分泌蛋白的产生和释放以时间和组织特异性方式受旁分泌和自分泌的严格调控<sup>[19]</sup>。细胞因子是一种小蛋白(15~60 kDa), 通过特定的细胞表面受体局部作用来协调免疫系统和周围组织的相互作用。巨噬细胞分泌多种细胞因子, 包括白细胞介素(interleukin, IL, 如IL-1/6/10/12)、干扰素(interferon, IFN)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumour necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte macrophage-colony stimulating factor, GM-CSF)<sup>[21]</sup>。这些细胞因子已在许多物种的卵巢中被发现, 并影响卵巢功能的许多方面, 包括卵泡发育和排卵等。

巨噬细胞也产生和分泌趋化因子, 这是一种含有保守半胱氨酸残基的小型(60~70个氨基酸)趋化细胞因子, 是白细胞募集和激活的重要介质<sup>[24]</sup>。趋化因子由2个家族组成, C-C家族和C-X-C家族。其中, C-C家族对单核细胞/巨噬细胞具有强大的趋化作用, 包括单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)、MCP-3和RANTES; C-X-C家族选择性地招募嗜中性粒细胞, 包括IL-8、上皮源性中性粒细胞引诱剂-78(epithelial-derived neutrophil attractant-78, ENA-78)和生长调节癌基因 $\alpha$ (growth-regulated oncogene  $\alpha$ , GRO $\alpha$ )。目前, 已经在大鼠卵巢中发现了几种趋化因子, 其中一些是由激素调节的<sup>[26]</sup>。

巨噬细胞分泌的生长因子包括表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和转化生长因子 $\alpha/\beta$ (transforming growth factor  $\alpha/\beta$ , TGF $\alpha/\beta$ ),

它们对卵巢的正常功能都很重要<sup>[4-5]</sup>。这些生长因子也由卵泡颗粒细胞和内膜细胞表达, 但巨噬细胞作为卵巢中这些生长因子的另一个潜在来源常被忽视。在大鼠发育卵泡周围的巨噬细胞中检测到EGF, 在功能性黄体内的巨噬细胞中检测到TGF, 表明巨噬细胞来源的生长因子在卵巢周期的特定阶段以旁分泌方式影响邻近细胞<sup>[4]</sup>。因为IGF在体外可调节单核细胞增殖和巨噬细胞产生细胞因子, 所以卵泡颗粒细胞和内膜细胞产生的IGF可以调节巨噬细胞的效应器功能。

## 2.3 分泌蛋白水解酶

巨噬细胞能够产生和释放一组高度多样化的蛋白水解酶, 这些酶能够降解ECM, 激活或抑制下游蛋白酶级联, 以及改变生物活性蛋白质, 如白细胞黏附分子、基质结合生长因子和膜结合细胞因子。半胱氨酸蛋白酶、组织蛋白酶S和D由大多数细胞(包括巨噬细胞)的溶酶体产生并定位于其中, 一些巨噬细胞具有分泌这些酶以进行细胞周围基质降解的专门能力<sup>[27]</sup>。这些组织蛋白酶中的每一种都在小鼠卵巢中被检测到, 并且显示出不同的细胞定位和激素调节模式<sup>[28]</sup>。尽管还不能明确这些蛋白酶是由卵巢巨噬细胞所分泌, 但一些组织蛋白酶蛋白优先表达于卵巢富含巨噬细胞的区域, 如卵泡内膜层、黄体和闭锁卵泡。

巨噬细胞产生的丝氨酸蛋白酶包括人白细胞弹性蛋白酶、蛋白酶3和组织蛋白酶G。另一个成员尿激酶型纤溶酶原激活剂(urokinase-type plasminogen activator, uPA)将纤溶酶原裂解为蛋白水解活性纤溶酶, 已在巨噬细胞及卵巢中进行了广泛研究。在小鼠卵巢中, 促性腺激素LH/hCG(Luteinizing hormone/human chorionic gonadotrophin)促进排卵反应, 除了颗粒细胞中uPA的高水平表达外, 在整个卵巢间质细胞中也诱导表达了uPA和组织型纤溶酶原激活剂(tissue-type plasminogen activator, tPA), 这可能是卵巢巨噬细胞分泌的<sup>[29]</sup>。在一些物种的卵巢中也检测到了基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP), 主要由巨噬细胞产生, 一般认为, MMP调节卵巢的多种功能<sup>[3-5]</sup>。例如, MMP-2、MMP-9和MMP-1(啮齿类动物中的MMP-13)在排卵时的卵泡内膜细胞层中表达和发挥活性。MMP-14和MMP-19在颗粒细胞中表达之前, 排卵前卵泡周围的巨噬细胞样细胞在LH/hCG排卵作用下也快速表达。

MMP-3、MMP-7和MMP-11在发生凋亡的卵巢区域上调,同时巨噬细胞浸润到这些部位。

### 3 巨噬细胞在卵泡发育与排卵过程中的作用

巨噬细胞在卵巢中的存在已经被证实多年了,它们在发情周期中的特定分布和时间变化表明巨噬细胞在卵巢内事件中具有多种作用。它们调节卵巢细胞增殖、炎症和类固醇生成的能力进一步表明这些细胞是卵巢功能的重要调控因子。

#### 3.1 巨噬细胞在卵泡发育过程中的作用

卵泡发育发生在原始卵泡被招募后,进行颗粒细胞和卵泡内膜细胞的增殖,以及卵泡腔的形成,从而响应FSH、雌激素和其他局部产生的因子<sup>[11-18]</sup>。然而,只有一小部分卵泡可以发育到排卵前阶段并最终排卵。大多数死于卵泡闭锁,颗粒细胞凋亡,卵泡退化并被卵巢吸收<sup>[15-17]</sup>。巨噬细胞和原始卵泡之间没有直接的相互作用,因此卵泡发育的早期阶段似乎不受巨噬细胞的影响。然而,在卵泡发育过程中,卵巢巨噬细胞的分布发生变化,它们的数量增加并定位于健康卵泡的卵泡内膜细胞层。

2个啮齿类动物模型显示,卵巢巨噬细胞数量减少,卵泡发育减少,生育能力受损。第一种是骨质疏松(op/op)小鼠,由于*CSF-1*基因的自然突变,成熟巨噬细胞数量严重减少。这些小鼠的下丘脑病变影响发情周期性,但卵巢巨噬细胞数量减少,这可能是卵泡发育减少的原因或结果<sup>[30]</sup>。第二种是限制大鼠的进食也会减少排卵前卵泡周围的巨噬细胞数量,表明营养和卵巢巨噬细胞数量有关<sup>[24]</sup>。卵巢巨噬细胞的激活状态也可能在卵泡发育过程中受到调节。在啮齿类动物卵泡发育的早期阶段,*CSF-1*既增加了卵巢巨噬细胞的数量,又上调了巨噬细胞清道夫受体的活性。在卵泡发育的同时,卵巢巨噬细胞和卵泡内膜-间质细胞合成和释放的细胞因子GM-CSF也增加。

目前认为,位于生长卵泡内膜的巨噬细胞通过分泌生长因子和/或细胞因子,在促进细胞增殖和卵泡发育、抑制卵泡凋亡方面发挥协同作用。大鼠卵巢颗粒细胞与腹腔巨噬细胞共培养可导致颗粒细胞增殖,且影响卵泡发育的细胞因子有肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、

EGF、TGF $\alpha/\beta$ 和IGF<sup>[31-35]</sup>。虽然巨噬细胞并不是卵巢中这些因子的唯一来源,但它们在卵巢中的特异性定位使它们可产生旁分泌影响。HGF由激活的巨噬细胞产生,在生长卵泡中发现该因子的受体,HGF在体外刺激颗粒细胞增殖并阻止颗粒细胞凋亡<sup>[31-32]</sup>。bFGF是血管生成的主要调节因子,也是由巨噬细胞产生的。bFGF在颗粒细胞有丝分裂和分化、卵泡内膜细胞分化中起调节作用,并能阻止培养过程中颗粒细胞的自发凋亡<sup>[32-33]</sup>。EGF和TGF $\alpha$ 存在于大鼠、牛和人卵巢的内膜层细胞中,EGF刺激卵泡DNA合成的程度相当于仓鼠的FSH,而在促性腺激素激发的未成熟大鼠中,通过旁分泌机制刺激颗粒细胞增殖和调节卵泡发育<sup>[34-35]</sup>。TGF $\beta$ 还可以增强FSH对颗粒细胞DNA合成和卵泡生长的影响。同样,IGF在卵巢细胞中促进促性腺激素刺激的细胞增殖和类固醇生成。

#### 3.2 巨噬细胞在卵泡闭锁过程中的作用

在哺乳动物卵巢卵泡发育过程中,99%以上的卵泡将经历闭锁这一退化过程,只有少数可以发育至排卵,这种选择主要依赖于颗粒细胞凋亡,但其调控机制仍不清楚。卵巢卵泡闭锁通常分为5个阶段:第一阶段为健康卵泡;第二阶段为早期闭锁卵泡,基底膜不清,颗粒细胞凋亡;第三阶段为进展性闭锁卵泡,凋亡颗粒细胞完全从基底膜扩散;第四阶段为晚期闭锁卵泡,溶酶体活性增加;第五阶段为破裂的闭锁卵泡,膜细胞塌陷,溶酶体活性强。巨噬细胞是卵巢内最丰富的免疫细胞,对于卵泡闭锁时清除凋亡碎片是必不可少的。

巨噬细胞虽然参与了各种卵巢过程,但其功能作用尚未完全确立。因此,TURNER等<sup>[36]</sup>利用白喉毒素(DT)对成年雌性大鼠卵巢巨噬细胞进行特异性消除,通过组织化学染色观察细胞形态学变化,免疫组化法鉴定巨噬细胞,内皮细胞标记物CD31定量血管变化,结果发现,在正常卵巢中,在黄体、正常卵泡膜层和闭锁卵泡中检测到巨噬细胞,但随着巨噬细胞消融术的进行,卵巢出血量增加,影响了黄体和卵泡膜组织,这与内皮细胞显著耗竭、红细胞积聚增加和滤泡闭锁增加有关,随后发生坏死和严重的结构损伤。这种变化仅限于卵巢,因为DT处理不会破坏其他组织的血管系统,这可能反映了卵巢血管系统的独特周期性和不同组织内巨噬细胞之间的异质性。这些结果表明,巨噬细胞在维持卵巢血管完

整性中起着关键作用<sup>[5,36]</sup>。在闭锁的卵泡中,大量凋亡的颗粒细胞被两种吞噬细胞所清除:完整的颗粒细胞和巨噬细胞。在对豚鼠卵巢闭锁卵泡内死亡颗粒细胞的吞噬细胞进行形态学研究时发现,早期闭锁卵泡中有两种吞噬细胞:一种是完整的颗粒细胞,吞噬邻近的死颗粒细胞;另一种是大的圆形细胞,由于其具有较强的酸性磷酸酶活性和MR-1免疫反应性,被鉴定为巨噬细胞<sup>[3,37]</sup>。完整的颗粒细胞参与闭锁早期死亡颗粒细胞的吞噬作用。此外,巨噬细胞存在于大的闭锁卵泡中,以清除死亡的颗粒细胞及其碎片。这两种吞噬细胞在卵泡中一直存在,直到其闭锁晚期。在卵巢的大卵泡中,很少能看到巨噬细胞。这些结果表明,卵泡内巨噬细胞和完整的颗粒细胞在卵泡发育的动态过程中起着重要作用,尤其是卵泡闭锁过程<sup>[3,37]</sup>。巨噬细胞上的CD44是一种吞噬受体,参与凋亡细胞的吞噬。MIYAKE等<sup>[38]</sup>研究发现,表达CD44的巨噬细胞在猪卵巢卵泡闭锁的第三阶段侵入卵泡内部,并伴有基底膜塌陷;在第三至第四阶段巨噬细胞侵入闭锁卵泡后,巨噬细胞表达的CD44被聚乳酸糖基化;溶酶体活性在第四阶段开始增加,在第五阶段达到最高水平。因此,第三阶段巨噬细胞CD44蛋白的增加与多聚乳糖胺对CD44的翻译后修饰可能参与了清除凋亡颗粒细胞。

巨噬细胞在卵泡闭锁晚期的颗粒细胞层中被发现,由于其吞噬凋亡细胞,被认为参与清除颗粒细胞凋亡过程中产生的细胞碎片<sup>[3-5]</sup>。然而,它们也可能在促卵泡闭锁因子的产生中发挥积极作用。巨噬细胞体外产生的细胞因子,特别是TNF $\alpha$ ,可诱导卵巢细胞凋亡和卵泡闭锁<sup>[39]</sup>。

### 3.3 巨噬细胞在卵泡排卵过程中的作用

在哺乳动物中,卵巢的排卵过程包括排卵前卵泡破裂和卵母细胞挤入输卵管<sup>[8-18]</sup>。哺乳动物的排卵与炎症反应相似,具有水肿、血管扩张和疼痛等特征。在促性腺激素诱导未成熟大鼠排卵的过程中,卵巢血容量增加,血管扩张引起水肿,血管通透性增加,持续到卵泡破裂<sup>[15-17]</sup>。炎症介质如前列腺素、白三烯、缓激肽、组胺、血小板活化因子和多种细胞因子被发现与排卵过程有关。血管通透性增加和水肿与内胶原和细胞外基质溶解有关,最终导致卵泡破裂。

巨噬细胞是排卵过程的重要促进因子,它们在排卵前迁移进入成熟卵泡内膜层的数量增多,这种募

集增加可能是局部调节趋化因子产生的反应<sup>[3-5]</sup>。例如,LH/hCG诱导大鼠和人颗粒细胞中MCP-1 mRNA的表达。用白细胞灌注排卵前大鼠卵巢可增加注射LH后释放的卵母细胞数量,且用氯膦酸盐囊内脂质体耗竭小鼠卵巢巨噬细胞可降低排卵率,并延缓随后发情周期的进展,表明免疫细胞在复杂的排卵级联反应中起着重要作用。巨噬细胞能够释放大量细胞因子,尤其是IL-1 $\beta$ 和TNF $\alpha$ ,在排卵过程中非常重要。随着排卵的临近,卵巢中IL-1 $\beta$ 水平增加,向体外灌注卵巢培养基中添加IL-1 $\beta$ 可刺激大鼠和兔子排卵,注射IL-1受体拮抗剂(IL-1 receptor antagonist, IL-1RA)可抑制体内排卵。此外,一氧化氮(nitric oxide, NO)是IL-1促炎作用的重要介质,可通过突变小鼠最佳排卵率证明;另外,利用药物抑制剂L-NAME抑制NO的产生,可减少卵巢白细胞数量和排卵率。TNF- $\alpha$  mRNA和蛋白的表达主要定位于卵巢间质内的巨噬细胞样细胞,可刺激灌流大鼠卵巢中LH诱导的排卵,并诱导体外培养的排卵前大鼠卵泡中排卵调节因子的产生<sup>[39]</sup>。所以,内膜层细胞释放的TNF $\alpha$ 通过刺激局部细胞凋亡,从而促进卵泡破裂。

在排卵前,卵泡顶端产生的蛋白酶对排卵时基底膜和卵泡壁的降解至关重要,如胶原酶/蛋白酶活性的抑制导致排卵受到抑制。巨噬细胞和单核细胞产生一系列能够降解所有类型基质蛋白的蛋白酶,排卵前卵泡内膜中的巨噬细胞在局部产生旁分泌或自分泌调节因子的影响下产生蛋白水解酶。例如,巨噬细胞产生的纤溶酶原激活剂注入兔子卵巢时,会迅速触发排卵。此外,纤溶酶原激活物tPA和uPA双重缺陷的小鼠会出现排卵障碍。蛋白前体转化酶4(proprotein convertase 4, PC4)定位于小鼠卵巢中的巨噬细胞样细胞,可调节这些细胞产生细胞因子<sup>[40]</sup>。敲除PC4基因小鼠表现出卵巢重量减少、孕酮分泌减少和产仔数减少,表明卵巢巨噬细胞蛋白酶和雌性生殖能力之间存在必然联系。

## 4 巨噬细胞在卵巢疾病中的作用

巨噬细胞影响卵巢功能的多个方面,并受到激素、细胞因子和基质信号的精确调控,最近的研究发现巨噬细胞和巨噬细胞衍生产物也参与了一些卵巢功能障碍,如卵巢早衰(premature ovarian failure, POF)和多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)。

#### 4.1 卵巢早衰

POF被定义为一种以卵巢功能停止和40岁前出现更年期为特征的综合征, 估计影响1%的女性<sup>[41]</sup>。POF患者表现为低雌激素、无排卵等现象, 在某些情况下, 还存在各种细胞免疫缺陷<sup>[41]</sup>。利用HLA I类抗原作为巨噬细胞的标记物, 发现一些自身免疫病患者类似于I型糖尿病患者, 具有自身抗原呈递缺陷。此外, 自身免疫性POF患者CD8阳性T细胞明显增多。在正常人卵巢中, 巨噬细胞偶尔呈MHC II类阳性, 颗粒细胞呈阴性, 而POF患者颗粒细胞中普遍存在MHC II类分子的表达, 表明POF可能与颗粒细胞MHC II类抗原表达有关, 可以用细胞因子 $IFN\gamma$ 体外培养颗粒细胞来模拟这一现象<sup>[42]</sup>。由此可见, 自身免疫和白细胞表面标志物异常表达的数据有助于我们在卵巢完全衰竭之前进行早期诊断。另外, 巨噬细胞及其分泌产物在卵巢疾病中的确切功能尚不清楚, 还需要更多的研究来描述卵巢巨噬细胞的特殊功能, 确定它们在体内的作用及其调控。

#### 4.2 多囊卵巢综合征

PCOS是年轻女性最常见的激素紊乱性疾病, 估计有5%~10%的女性在生育期内或之后受到影响<sup>[18]</sup>。PCOS导致无排卵, 从而影响生育能力, 但它是一种多系统疾病, 与高胰岛素血症、高脂血症、糖尿病、肥胖、高雄激素血症、多毛症、痤疮和子宫内膜癌发病率增加有关<sup>[13-14, 17-18]</sup>。PCOS患者表现为慢性轻度炎症, C反应蛋白水平升高<sup>[44]</sup>。免疫调节疗法, 如地塞米松通常被用于缓解PCOS症状, 这进一步证明白细胞参与了该综合征。另一种治疗PCOS的方法是腹腔镜激光打孔, 它需要穿透卵巢表面。激光钻孔会导致巨噬细胞和淋巴细胞的流入, 在卵巢中诱导促炎性反应, 有助于排卵。最近临床试验发现, 治疗PCOS最有效的药物是抗糖尿病药物二甲双胍和曲格列酮(PPAR $\gamma$ 受体激动剂)<sup>[13-14]</sup>。PPAR $\gamma$ 配体因其在脂肪细胞中的胰岛素敏感性而被广泛研究, 它们也在巨噬细胞中发挥强大的抗炎作用。在PCOS患者中, 二甲双胍治疗不仅提高了PCOS患者的胰岛素敏感性, 而且还降低了炎症反应(以C反应蛋白水平衡量)<sup>[13-14, 17-18]</sup>。

卵泡的正常发育依赖于适当的细胞因子和生长因子环境, 巨噬细胞是这些因子的重要来源之一, 因此, 许多研究比较了PCOS患者和非PCOS患者的血清和卵泡液细胞因子水平<sup>[18]</sup>。在一项对非肥胖/

非糖尿病PCOS患者的研究中, 与正常对照组相比, 患者血清和卵泡液中 $TNF\alpha$ 和IL-6水平升高。在一组肥胖的PCOS患者中, 地塞米松治疗可改变卵泡液细胞因子水平, 表明免疫细胞可能至少部分参与卵泡液细胞因子的产生; 与未经治疗的PCOS患者相比, 地塞米松治疗组的患者IL-6水平没有变化, 但CSF-1水平升高,  $TNF\alpha$ 水平降低, 均与卵泡雌二醇增加有关。

#### 5 小结与展望

卵巢巨噬细胞在免疫系统和生殖系统之间进行复杂对话过程中发挥着非常重要的调节作用。根据发情周期的不同阶段, 它们在数量和表型上都会发生变化, 并通过分泌一些生物活性分子, 影响卵巢生理过程。巨噬细胞能够调节细胞增殖、分化和凋亡, 并在卵泡发育和排卵过程中影响类固醇生成和组织重塑等。巨噬细胞介导的某些生理过程调节的改变可导致卵巢疾病的发生。重要的是, 对卵巢巨噬细胞及其分泌产物的进一步深入研究, 将有助于对多囊卵巢综合征和卵巢早衰等卵巢疾病进行早期的诊断和最终的治疗。

#### 参考文献 (References)

- [1] GARCIA-GOMEZ E, VAZQUEZ-MARTINEZ E R, REYES-MAYORAL C, et al. Regulation of inflammation pathways and inflammasome by sex steroid hormones in endometriosis [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2020, 10: 935.
- [2] LU E, LI C, WANG J, et al. Inflammation and angiogenesis in the corpus luteum [J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2019, 45(10): 1967-74.
- [3] HOGG C, HORNE A W, GREAVES E. Endometriosis-associated macrophages: origin, phenotype, and function [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2020, 11: 7.
- [4] YANG X, GILMAN-SACHS A, KWAK-KIM J. Ovarian and endometrial immunity during the ovarian cycle [J]. *J Reprod Immunol*, 2019, 133: 7-14.
- [5] RIZOV M, ANDREEVA P, DIMOVA I. Molecular regulation and role of angiogenesis in reproduction [J]. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 2017, 56(2): 127-32.
- [6] BUTCHER E C. Leukocyte-endothelial cell adhesion as an active, multi-step process: a combinatorial mechanism for specificity and diversity in leukocyte targeting [J]. *Adv Exp Med Biol*, 1992, 323: 181-94.
- [7] ERWIG L P, KLUTH D C, WALSH G M, et al. Initial cytokine exposure determines function of macrophages and renders them unresponsive to other cytokines [J]. *J Immunol*, 1998, 161(4): 1983-8.
- [8] 张陈珊, 张正红, 张红, 等. AMPK对黄体脂滴代谢与类固醇激素产生的调节作用[J]. *生命科学*(ZHANG C S, ZHANG Z H, ZHANG H, et al. Regulatory effects of AMPK signaling on

- the metabolism of lipid droplets and the production of steroid hormones in the corpus luteum [J]. *Chinese Bull Life Sci*, 2019, 31(10): 1041-6.
- [9] 吴艳青, 陈丽云, 张正红, 等. 磷脂酰肌醇-3激酶/蛋白激酶B/骨形态发生蛋白-15通路 with 哺乳动物卵巢卵泡发育[J]. *中国医学科学院学报* (WU Y Q, CHEN L Y, ZHANG Z H, et al. Effects of phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B/bone morphogenetic protein-15 pathway on the follicular development in the mammalian ovary [J]. *Acta Acad Med Sine*, 2013, 35(3): 224-8.
- [10] ZHANG Z, HUANG Y, ZHANG J, et al. Activation of NF- $\kappa$ B signaling pathway during HCG-induced VEGF expression in luteal cells [J]. *Cell Biol Int*, 2019, 43(3): 344-9.
- [11] ZHANG Z, WANG F, ZHANG Y. Expression and contribution of NLRP3 inflammasome during the follicular development induced by PMSG [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2019, 7: 256.
- [12] TANG Z, ZHANG Z, TANG Y, et al. Effects of dimethyl carbonate-induced autophagic activation on follicular development in the mouse ovary [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(6): 5981-9.
- [13] WANG F, WANG S, ZHANG Z, et al. Defective insulin signaling and the protective effects of dimethyldiguanide during follicular development in the ovaries of polycystic ovary syndrome [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(6): 8164-70.
- [14] WANG F, ZHANG Z, WANG Z, et al. Expression and clinical significance of the HIF-1 $\alpha$ /ET-2 signaling pathway during the development and treatment of polycystic ovary syndrome [J]. *J Mol Histol*, 2015, 46(2): 173-81.
- [15] WU Y, ZHANG Z, LIAO X, et al. Effect of high-fat diet-induced obesity on the Akt/FoxO/Smad signaling pathway and the follicular development of the mouse ovary [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(4): 3894-900.
- [16] WU Y, ZHANG Z, LIAO X, et al. High fat diet triggers cell cycle arrest and excessive apoptosis of granulosa cells during the follicular development [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 466(3): 599-605.
- [17] 王凡, 肖开转, 林超奇, 等. PI3K信号通路对哺乳动物HPG轴的调控作用[J]. *中国细胞生物学学报* (WANG F, XIAO K Z, LIN C Q, et al. Regulatory effects of PI3K signaling on HPG axis in mammals [J]. *Chinese J Cell Biol*, 2013, 35(7): 1068-72.
- [18] 王凡, 张正红, 肖开转, 等. 下丘脑-垂体-肾上腺轴和下丘脑-垂体-卵巢轴在多囊卵巢综合征神经内分泌功能紊乱中的作用[J]. *中国医学科学院学报* (WANG F, ZHANG Z H, XIAO K Z, et al. Roles of hypothalamic-pituitary-adrenal axis and hypothalamus-pituitary-ovary axis in the abnormal endocrine functions in patients with polycystic ovary syndrome [J]. *Acta Acad Med Sine*, 2017, 39(5): 669-704.
- [19] CAPRARA G, ALLAVENA P, ERRENI M. Intestinal macrophages at the crossroad between diet, inflammation, and cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(14): 4825.
- [20] CECILIANI F, AVILA-MORALES G, DE-MATTEIS G, et al. Methods in isolation and characterization of bovine monocytes and macrophages [J]. *Methods*, 2020, doi: 10.1016/j.ymeth.2020.06.017
- [21] WU M Y, LU J H. Autophagy and macrophage functions: inflammatory response and phagocytosis [J]. *Cells*, 2019, 9(1): 70.
- [22] NICOLAS F E, MURCIA L, NAVARRO E, et al. Mucorales species and macrophages [J]. *J Fungi (Basel)*, 2020, 6(2): 94.
- [23] URIBE-QUEROL E, ROSALES C. Phagocytosis: our current understanding of a universal biological process [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1066.
- [24] HARTENSTEIN V, MARTINEZ P. Phagocytosis in cellular defense and nutrition: a food-centered approach to the evolution of macrophages [J]. *Cell Tissue Res*, 2019, 377(3): 527-47.
- [25] ITOH M, YANO A, LI X, et al. Limited uptake of foreign materials by resident macrophages in murine ovarian tissues [J]. *J Reprod Immunol*, 1999, 43(1): 55-66.
- [26] WONG K H, NEGISHI H, ADASHI E Y. Expression, hormonal regulation, and cyclic variation of chemokines in the rat ovary: key determinants of the intraovarian residence of representatives of the white blood cell series [J]. *Endocrinology*, 2002, 143(3): 784-91.
- [27] OWEN C A, CAMPBELL E J. Extracellular proteolysis: new paradigms for an old paradox [J]. *J Lab Clin Med*, 1999, 134(4): 341-51.
- [28] OKSJOKI S, SODERSTOM M, VUORIO E, et al. Differential expression patterns of cathepsins B, H, K, L and S in the mouse ovary [J]. *Mol Hum Reprod*, 2001, 7(1): 27-34.
- [29] HAGGLUND A C, NY A, LIU K, et al. Coordinated and cell-specific induction of both physiological plasminogen activators creates functionally redundant mechanisms for plasmin formation during ovulation [J]. *Endocrinology*, 1996, 137(12): 5671-7.
- [30] COHEN P E, ZHU L, NISHIMURA K, et al. Colony-stimulating factor 1 regulation of neuroendocrine pathways that control gonadal function in mice [J]. *Endocrinology*, 2002, 143(4): 1413-22.
- [31] LING L, FENG X, WEI T, et al. Human amnion-derived mesenchymal stem cell (hAD-MSC) transplantation improves ovarian function in rats with premature ovarian insufficiency (POI) at least partly through a paracrine mechanism [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 46.
- [32] DING C, ZOU Q, WANG F, et al. HGF and BFGF secretion by human adipose-derived stem cells improves ovarian function during natural aging via activation of the SIRT1/FOXO1 signaling pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 45(4): 1316-32.
- [33] MOTOZAWA K, MOTOYOSHI M, SAIKI A, et al. Functional comparison of high and low molecular weight basic fibroblast growth factors [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(9): 7818-26.
- [34] TEPEKOY F, AKKOYUNLU G. The interaction of Wnt signaling members with growth factors in cultured granulosa cells [J]. *Anim Reprod*, 2020, 17(2): e20190106.
- [35] LUO Y, ZHANG R, GAO J, et al. The localization and expression of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in bovine ovary during oestrous cycle [J]. *Reprod Domest Anim*, 2020, 55(7): 822-32.
- [36] TURNER E C, HUGHES J, WILSON H, et al. Conditional ablation of macrophages disrupts ovarian vasculature [J]. *Reproduction*, 2011, 141(6): 821-31.
- [37] KASUYA K. Elimination of apoptotic granulosa cells by intact granulosa cells and macrophages in atretic mature follicles of the guinea pig ovary [J]. *Arch Histol Cytol*, 1997, 60(2): 175-84.
- [38] MIYAKE Y, MATSUMOTO H, YOKOO M, et al. Expression and glycosylation with polylectosamine of CD44 antigen on macrophages during follicular atresia in pig ovaries [J]. *Biol Reprod*, 2006, 74(3): 501-10.
- [39] PIERSANTI R L, SANTOS J E P, SHELDON I M, et al. Lipopolysaccharide and tumor necrosis factor-alpha alter gene expres-

- sion of oocytes and cumulus cells during bovine *in vitro* maturation [J]. *Mol Reprod Dev*, 2019, 86(12): 1909-20.
- [40] LI M, MBIKAY M, ARIMURA A. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide precursor is processed solely by prohormone convertase 4 in the gonads [J]. *Endocrinology*, 2000, 141(10): 3723-30.
- [41] ZHANG J, HUANG X, LIU Y, et al. A comparison of the effects of Chinese non-pharmaceutical therapies for premature ovarian failure: a PRISMA-compliant systematic review and network meta-analysis [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99(26): e20958.
- [42] SPANEL-BOROWSKI K. Footmarks of innate immunity in the ovary and cytokeratin-positive cells as potential dendritic cells [J]. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 2011, 209: 1-99.