

自噬与哺乳动物卵泡闭锁

吴春丽 郭燕君 徐海琦 蒋晓丽 徐 莹*

(嘉兴学院医学院, 嘉兴 314001)

摘要 自噬现象广泛存在于所有真核生物中, 是一种在正常或病理状态下细胞中普遍存在的生理机制。在哺乳动物卵巢中, 不到1%的卵泡能完成排卵, 大多数卵泡发生闭锁, 自噬和细胞凋亡共同参与调节卵巢卵泡的发育和闭锁, 自噬在原始卵泡和初级卵泡闭锁中可能发挥非常重要的作用。自噬发生于哺乳动物卵巢的颗粒细胞、膜细胞和卵母细胞, 其中颗粒细胞是发生自噬的主要细胞, 与细胞凋亡密切相关。

关键词 自噬; 凋亡; 卵泡闭锁; 颗粒细胞; 卵泡发育

Autophagy and Mammalian Follicular Atresia

Wu Chunli, Guo Yanjun, Xu Haiqi, Jiang Xiaoli, Xu Ying*

(Medical college of Jiaxing University, Jiaxing 314001, China)

Abstract Autophagy, namely type II programmed cell death, widely exists in all eukaryotes, and is a kind of physiological mechanism widespread in the cells of normal and pathological states. In mammalian ovary, the oocytes that are selected for release constitute less than 1% of the total; the remainder is removed via the process of follicular atresia. Therefore, both apoptosis and autophagy are involved in the regulation of granulosa cell death during ovarian follicular development and atresia. Autophagy may play an important role in primordial follicles and primary follicular atresia. It may occur in granulosa cells, theca cells and oocytes. However, granulosa cells are the main cells in which autophagy take place in mammalian ovary, and are associated with cell apoptosis.

Key words autophagy; apoptosis; atresia; granulosa cell; follicular development

1 自噬研究的概况

自噬(autophagy)是指一些需降解的蛋白质和细胞器等胞浆成分被包裹, 并最终运送至溶酶体降解的过程, 降解产生的氨基酸和其他小分子物质可被再利用或产生能量。发生自噬时, 细胞内形成一种小囊泡样的自噬前体(phagosome), 然后包裹胞浆成分形成双层膜结构, 即自噬体(autophosome), 自噬体与溶酶体融合形成自噬溶酶体(autopholysome), 然

后溶酶体酶降解、利用包裹的胞浆成分^[1]。自噬是以自噬体出现为特征的一种通过溶酶体(lysosome)的降解路径^[1], 不依赖于一系列蛋白水解酶[胱冬肽酶(caspases)]的参与^[2]。通过对自噬的调控可能对感染、神经病变、癌症和老化具有治疗作用^[3]。对大多数哺乳动物自噬的调控研究主要集中于PI3K/PKA/mTOR途径, 进而探讨受此途径影响的自噬相关基因的表达。

收稿日期: 2013-03-08 接受日期: 2013-05-10

浙江省自然科学基金(批准号: Y2110873)、嘉兴学院重点SRT项目(批准号: 851712003)和浙江省大学生科技创新计划(批准号: 2012R417009)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0573-83643850, E-mail: xuyingmrd@yahoo.com

Received: March 8, 2013 Accepted: May 10, 2013

This work was supported by the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (Grant No.Y2110873) and Key Projects of Jiaxing University SRT Fund (Grant No.851712003) and Zhejiang Provincial University Student Innovation Project (Grant No.2012R417009)

*Corresponding author. Tel: +86-573-83643850, E-mail: xuyingmrd@yahoo.com

网络出版时间: 2013-08-19 16:16 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130819.1616.001.html>

2 参与自噬的分子

参与自噬调控的基因称为Atg(autophagy related gene)^[4], 目前已发现了30多个参与自噬的基因^[5], 包括调节自噬蛋白Atg12-Atg5结合系统和LC3脂化系统的相关分子^[6]、Beclin-1复合物和磷脂酰肌醇三磷酸(PI3)激酶^[7]。另外, 细胞骨架成分^[8]、凋亡相关因子线粒体调控相关分子、钙离子浓度及相关调节基因、蛋白质乙酰化等也参与自噬的调控。其中微管相关蛋白1轻链3(LC3)是Atg8在哺乳动物的同源基因^[9], 自噬发生时可溶形式LC3-I可降解为脂溶形式LC3-II^[10]。LC3-II结合在自噬体膜上直到与溶酶体融合, 因此LC3-II的水平在某种程度上反映了自噬体的数量^[10-13]。Beclin-1基因是Atg6的哺乳动物同源基因^[8,14]。Beclin-1主要是通过参与自噬相关蛋白如Bcl-2、Vps34、p150、UVRAG、Bif-1、Atg14等形成多蛋白复合体调控自噬。活性氧(reactive oxygen species, ROS)损伤线粒体, 释放促凋亡因子, 导致细胞死亡^[17], 细胞通过清除受损或老化的线粒体, 发生线粒体自噬(mitophagy)^[18], 维持细胞内环境的稳定^[19]。其中, PINK1和Parkin在介导线粒体自噬方面具有重要作用^[20]; 在线粒体形态的调控方面, MFN1、MFN2和OPA1在哺乳动物细胞线粒体融合中是缺一不可的^[21]。钙离子参与自噬体的形成与成熟过程^[22], 胞内游离钙浓度可以调控自噬的发生^[23]。多种钙离子激动剂能够抑制雷帕霉素靶位(target of rapamycin, TOR)的活性, 从而促进自噬体的形成; CamKKII-AMPK-TSC1/2-RHEB-mTORC1通路可以通过调节细胞内的钙离子浓度从而调控自噬的发生^[24]。最近的研究表明, 蛋白质乙酰化作用调控自噬, 乙酰化酶Esa1和去乙酰化酶Rpd3参与调控自噬。自噬信号元件Atg3是Esa1的底物, Esa1的哺乳动物同源物Tip60同样影响了细胞自噬的发生^[15-16]。

3 自噬的研究方法

3.1 透射电子显微镜检测自噬体

透射电子显微镜检测自噬体的结构, 是目前在细胞中检测自噬体^[25]的标准方法。细胞胞浆在即将发生自噬时, 会出现许多游离的双层膜结构, 并逐渐形成杯状凹陷的自噬前体, 自噬前体逐渐延伸, 包裹细胞质或损伤的细胞器, 形成泡状结构的自噬体^[8,26]。

3.2 检测自噬体标记蛋白

LC3-II定位于隔离膜和自噬体^[27]上, 与自噬体

的数量相关。LC3-I在细胞质以及细胞核内呈弥漫性表达, 但LC3-II在细胞质中呈点状结构^[28]。因此通过免疫荧光染色可对内源性的LC3进行亚细胞定位, 评估自噬体的积累^[29], 并可通过观察GFP与LC3融合蛋白的表达进行定位^[11]。另外, 溶酶体相关蛋白LAMP1也经常作为观察自噬的标记分子^[30]; 在线粒体介导的自噬中线粒体融合蛋白MFN1和MFN2也经常作为观察的靶分子^[31]。

3.3 自噬调控的研究策略

在体外培养系统中可通过药物处理、自噬基因敲除、沉默和过表达的方法, 激活或者抑制自噬^[11]。富营养条件、6-氨基-3-甲基嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)、长春花碱、nocodazole^[32]、巴佛洛霉素A1(bafilomycin A1, Baf A1)^[29]、氯化铵、氯喹、E64d、pepstatin A、Okadaic acid、3,4-二磷酸磷脂酰肌醇、3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇、渥曼青霉素(wortmannin)、LY294002等抑制自噬的发生; 而营养缺乏(特别是氨基酸缺乏, 如无血清饥饿培养)、雷帕霉素(rapamycin)及其类似物CCI-779、Torin1^[33]、PP242、Lithium^[34]、ABT737^[35]、Trehalose^[36]、small-molecule enhancers of rapamycin^[37-38]、酵母细胞Tor2磷酸化、3-磷酸磷脂酰肌醇及高浓度的cAMP等^[11]激活自噬。

4 卵泡发育、闭锁与自噬

卵泡发育是一个连续的变化过程, 一般可分为原始卵泡、初级卵泡、次级卵泡和成熟卵泡。原始卵泡在无外界刺激的情况下增殖和发育时, 只有少数发育, 其余保持静止状态。启动卵泡生长需要卵泡刺激素(FSH), 还需来自颗粒细胞、膜细胞和卵母细胞分泌的调节因子的作用^[39], 卵母细胞-颗粒细胞-膜细胞通过相互作用, 调节卵泡生长^[40]。卵母细胞产生的生长分化因子(GDF-9)通过抑制颗粒细胞凋亡和抑制卵泡闭锁, 促进卵泡的生存和增殖; 同时GDF-9通过上调膜细胞雄性激素的含量促进腔前卵泡(preantral follicle)的生长。在卵母细胞中敲除GDF-9, 导致颗粒细胞的增殖下降, 出现异常的卵母细胞生长, 并且卵泡不能发育到次级卵泡阶段。另外, 下调GDF-9的表达, 可以促进caspase-3的活化和颗粒细胞的凋亡。膜性因子EGF、TGF- α 、KGF和BMP-7促进颗粒细胞增殖, 抑制其凋亡^[41]。

人类早期生长阶段的初级卵泡和次级卵泡颗

粒细胞的增殖显著(在数量和尺寸上迅速增长), 颗粒细胞层数逐渐增多, 颗粒细胞间出现一些小腔隙, 并逐渐融合成卵泡腔。在FSH作用的基础上, 经黄体生成素(LH)的刺激, 次级卵泡发育为成熟卵泡。卵巢内的多数卵泡发育到一定的阶段后停止发育并且退化, 发生卵泡闭锁现象。大多数哺乳动物的卵巢内卵泡数目会随年龄的增长不断减少, 在哺乳动物的卵巢中, 只有一小部分的卵泡成熟后参与排卵。出生10天后的小母猪的双侧卵巢中, 大约有500万个原始卵泡(牛、羊和小鼠的卵巢中分别有120万、110万和100万个原始卵泡)^[39,42]。但生育期的母猪, 最后参与排卵的卵母细胞不超过1 600个, 少于全部初级卵母细胞的0.14%, 其他均闭锁、退化; 新生儿两侧卵巢有70万~200万个原始卵泡, 7~9岁时约30万个, 青春期开始时为4万个, 40~50岁时仅有几百个, 大量卵泡均先后闭锁^[43]。卵泡闭锁是卵母细胞质量选择的一个重要的、正常的生理过程, 自噬和细胞凋亡可能参与调节卵巢卵泡的发育和闭锁^[29,41]。卵泡发育与闭锁具体过程如图1所示。

4.1 自噬和凋亡在卵泡闭锁中的作用

细胞的死亡包括凋亡、自噬和坏死。凋亡, 即I型程序性细胞死亡, 依赖胱冬肽酶的参与, 发生染色体浓聚、细胞皱缩、DNA降解和形成凋亡小体^[2]。

卵泡闭锁可能与颗粒细胞的凋亡有关。在卵泡闭锁过程中, 颗粒细胞开始从卵泡壁分离的卵泡, 称为早期闭锁卵泡; 如果颗粒细胞完全从卵泡壁分离, 则称为进展期闭锁卵泡。在哺乳动物卵巢中, 卵泡闭锁过程如下^[39]: (1)颗粒细胞中出现分散的细胞核(凋亡小体); (2)颗粒细胞层脱离卵泡的基底膜, 但它的结构并没有破坏; (3)基底膜开始破碎; (4)在卵泡腔, 巨噬细胞侵入卵巢基质间的区域, 发现细胞碎片; (5)卵泡消失。闭锁的卵泡的颗粒细胞发生DNA断裂, 发育中的卵泡颗粒细胞DNA并无明显断裂, 而DNA断裂是凋亡的形态学特征。

在卵泡闭锁期间, 细胞凋亡表现出DNA碎裂的形态学特征(TUNEL反应阳性), 染色质皱缩和细胞破裂, 形成凋亡小体。在鱼类卵泡闭锁的早期和进展期, TUNEL阳性反应的卵泡细胞数很少, 与此相反, 膜细胞凋亡常发生在卵泡闭锁的晚期。caspase-3的阳性反应表明细胞凋亡出现在卵泡闭锁晚期, 而在卵泡闭锁的早期, caspase-3反应较弱(阴性)。Bcl-2蛋白在卵泡闭锁的整个过程中存在于细胞质中。在卵泡闭锁的早期阶段, 颗粒细胞和膜细胞的染色较强; 在卵泡闭锁的进展期, 过度增长的卵泡细胞表达Bcl-2蛋白; 在卵泡闭锁的晚期阶段, 剩余的细胞始终表现出Bcl-2阳性。Bax蛋白的免疫荧

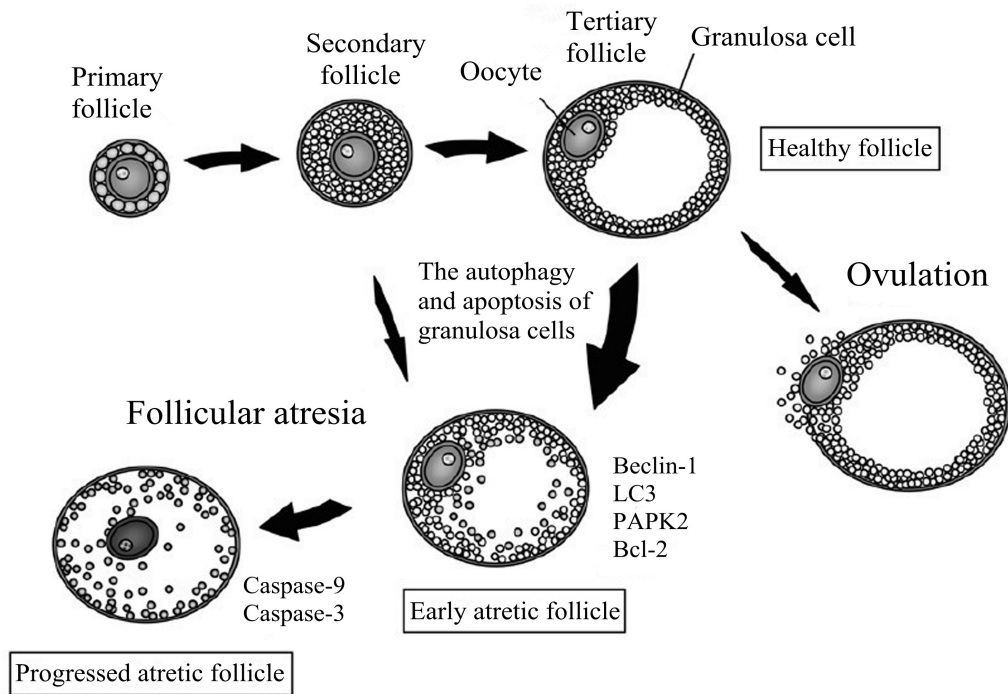


图1 卵泡发育与闭锁(根据参考文献[44]修改)

Fig.1 Development and atresia of follicles in ovaries (modified from reference [44])

光染色的特点是弥漫分散于整个细胞质中。在早期和进展期卵泡闭锁过程中, 卵泡细胞中发现有微弱和弥散性的着色。在卵泡闭锁的晚期, 颗粒细胞和膜细胞的细胞质中Bax被显著标记^[45]。

自噬被称为II型程序性死亡。尽管自噬和凋亡存在着差异, 但最近的研究发现, 在线粒体和死亡受体介导的细胞凋亡中, Beclin-1是caspase-3、-7、-8的剪切对象^[46], 这一重大的发现证明了自噬与凋亡存在分子联系。细胞凋亡和自噬被认为是代表一个细胞死亡机制的连续的部分: 自噬为凋亡所必需, 自噬先于凋亡, 进而促进凋亡; 或自噬抑制凋亡, 如在肿瘤细胞中自噬使凋亡率下降^[47]; 又或者自噬与凋亡共同促进细胞死亡, 抑制其中之一都会转变为另一种细胞死亡途径^[9,48]。在任何情况下, 积累自噬体都是调控细胞凋亡的关键过程。Western blot分析表明, 刚出生的雌性动物会经历一个由自噬介导而使卵泡闭锁加快的过程, 凋亡却在其后的卵泡闭锁过程中占优势, 因此卵巢卵泡的发育和闭锁过程可能包括凋亡和自噬两方面^[30,41]。

4.2 颗粒细胞自噬和卵泡闭锁

卵泡闭锁可能与细胞的凋亡有关, 颗粒细胞是细胞凋亡的主要靶细胞^[42], 诱导颗粒细胞自噬, 与诱导细胞凋亡密切相关^[28]。在卵泡闭锁的早期阶段, Beclin-1主要定位在颗粒细胞中, 然而caspase-3的表达是离散的; 在鱼类卵泡闭锁的进展期, 即使Beclin-1的信号偏高, caspase-3仍有明显的表达; 在卵泡闭锁的晚期, caspase-3在剩余闭锁卵泡的细胞中表达水平较高^[45]。

LC3蛋白在大鼠卵泡颗粒细胞中的表达最高, 这表明, 自噬作用主要发生在颗粒细胞, 自噬使颗粒细胞死亡可能参与卵泡闭锁^[29]。用血清饥饿法体外培养大鼠卵巢颗粒细胞, 观察其自噬体, 发现用3-MA(10 mmol/L)处理过的颗粒细胞中自噬体数量减少(3-MA通过抑制class III PI3K的活力来抑制自噬体的形成)^[49]; 与此相反, 当颗粒细胞用Baf A1(0.1 mmol/L)处理后, 细胞质中发现众多的自噬体(Baf A1可以通过减少自噬体与溶酶体的融合而引起自噬体的积累)^[50]。然而, 虽然在大鼠颗粒细胞的细胞质中观察到了自噬体的积累, 但细胞的死亡率和凋亡率, 并不高于用3-MA处理过的颗粒细胞的死亡率和凋亡率, 表明在血清不足的情况下, 自噬体在颗粒细胞中的积累并不足以诱导颗粒细胞的凋亡。而在血清不足的情况

下抑制HeLa细胞中的溶酶体^[13], 积累大量的自噬体可以促进细胞凋亡。这表明自噬体积累到一定的水平, 可能会促进颗粒细胞的凋亡^[29]。超微结构观察发现典型的自噬现象, 如在细胞内存在多个自噬空泡^[28], 说明在无血清条件下存在颗粒细胞自噬现象。非洲刺毛鼠(spiny mouse)有腔卵泡(antral follicles)发生闭锁的过程较缓慢, Szołtyś等^[51]的研究表明, 这与颗粒细胞的成熟状态有关, 未分化的比成熟的颗粒细胞更多地发生凋亡。

使用3-MA处理过的大鼠颗粒细胞, Bax和Bcl-2的表达水平并没有变化, 但是用Baf A1处理过的颗粒细胞的Bcl-2的表达水平下降, 表明Bcl-2的表达水平下降明显与自噬体的积累进而诱导颗粒细胞凋亡有关, 因为Bax和Bcl-2在细胞内的表达水平所占的比例, 决定细胞是否发生凋亡或者生存^[29]。由Baf A1诱导的自噬体的积累, 使活化的caspase-9和caspase-3的蛋白质表达水平都有显著的增加, 表明自噬体的积累增加颗粒细胞的凋亡, 是通过降低Bcl-2的表达水平和随后caspases的活化, 再通过活化caspases进一步降低Bcl-2的表达水平, 最终使自噬体积累, 诱导颗粒细胞的凋亡^[29]。

普通猪和小型猪在卵泡发育方面有很大的不同, 如具有不同的排卵和黄体化模式。此外, 自噬对这两种猪中的颗粒细胞的调控也不同。用雷帕霉素处理普通猪和小型猪体外培养的卵泡, 发现MAP1LC3A(microtubule-associated protein 1 light chain 3A)和ATG5(autophagy protein 5)在颗粒细胞中有较强的表达, 并且雷帕霉素处理后效果更显著。此外, 无论有无雷帕霉素处理, 普通猪卵泡中的MAP1LC3A和ATG5表达水平都高于小型猪。用雷帕霉素处理小型猪的颗粒细胞, 通过Western blot分析, 发现雷帕霉素提高了LC3A-I和LC3A-II的水平; 用雷帕霉素处理普通猪的颗粒细胞, 发现LC3A-I水平上升但LC3A-II水平下降, 说明自噬在调节猪卵泡细胞重塑系统中发挥重要作用^[52]。

用氧化性低密度脂蛋白(oxLDL)处理体外培养的人类颗粒细胞, 发现6 h后大约有30%的细胞显示MAP LC3阳性。用Western blot分析未发现可溶形式LC3-I分子, LC3-II的表达变化情况并不明显; 颗粒细胞的中间丝、微管等细胞骨架成分也参与形成自噬体^[53]。处理12 h后, 未发现LC3-I和LC3-II表达变化^[53]。这些结果表明人类颗粒细胞经过oxLDL的

处理会发生自噬现象, 用电子显微镜也发现了大量自噬泡的存在。

4.3 卵母细胞自噬和卵泡闭锁

有报道, PMSG处理21-23天Sprague-Dawley大鼠卵母细胞各发育阶段中均未检测到LC3的表达^[28], 第二次减数分裂中期卵母细胞几乎没有表现出自噬的现象^[54]。但通过分析Wistar大鼠发情周期各个阶段的卵泡, 检测DNA碎片和活化的caspase-3, 反映凋亡情况; 用LC3和Lamp1来定位自噬泡的形成, 从而评估自噬的发生。结果表明, 发情期的所有阶段都有许多已死亡的卵母细胞, 凋亡和自噬都参与其中; 凋亡在发情期处于最高水平, 然而自噬在发情前期处于最高水平; 在发情间期和发情后期阶段, 自噬和凋亡都处于较高水平^[30]。

在青春期前, 非洲刺毛鼠闭锁的原始卵泡和初级卵泡并没有发现凋亡现象。卵母细胞和颗粒细胞均未显示出核浓缩或活化的caspase-3, 并且TUNEL染色反应阴性。闭锁的有腔卵泡中的卵母细胞凋亡标志物也显示阴性。而且, 出生1~7天的非洲刺毛鼠卵巢中活化的caspase-3表达阴性。这些结果与Tingen等^[55]的报道相一致, Tingen等^[55]的研究也没有在出生后小鼠的闭锁原始卵泡和初级卵泡中检测到活化的caspase-3和PARP1[poly (ADPribose) polymerase 1], 并且TUNEL染色阴性。Tingen等^[55]假设卵母细胞被封闭在卵泡中避开了凋亡, 可能是与卵母细胞与颗粒细胞之间的交互作用能抑制卵母细胞发生凋亡有关。但是许多原始卵泡在出生后消失, 那么必然存在另一种卵母细胞的消除形式, 即自噬, 自噬已经成为一种重要的非凋亡性的细胞程序性死亡的机制。Hulas-Stasiak等^[41]揭示了闭锁的非洲刺毛鼠卵母细胞, 尤其是来源于原始卵泡和初级卵泡的卵母细胞, 自噬标记物Lamp1高表达。而且, Lamp1的表达在产后第一天明显增高。此外, 接近死亡的卵母细胞膜富含大量溶酶体、空泡和自噬体。

在一项大鼠的相似性研究中, Devine等^[56]在原始卵泡和初级卵泡中观察到卵母细胞中大量胞质空泡, 但却完全没有核浓缩出现; Rodrigues等^[57]对刚出生的小鼠进行研究, 其卵母细胞中溶酶体数量增加, 只有少数生殖细胞发生凋亡。这些都提示自噬是引起出生后生殖细胞消失的重要机制, 而不是凋亡。青春期前大鼠闭锁卵泡中卵母细胞死亡的过程中, Escobar等^[58]发现卵母细胞可以经历多种形式的

退化, 从自噬到凋亡, 直至两者共同作用导致细胞死亡。来源于新生大鼠的卵母细胞主要经历凋亡(活化的caspase-3和TUNEL反应阳性), 而在5, 10, 25, 28 d雌性大鼠的闭锁卵泡中, 大部分卵母细胞发现具有局部性的凋亡和自噬标记物的表达, 并且自噬标记物Lamp1和酸性磷酸酶强烈表达。Ortiz等^[59]的研究也观察到在大鼠闭锁的卵泡中, 其卵母细胞同时表达活化的caspase-3和Lamp1, 并且TUNEL反应阳性。Escobar等^[58]假设, 卵母细胞死亡可能最初起始于线粒体等细胞器的自噬降解, 之后促进了caspases的活化, 由此导致了DNA片段化, 且不伴随核浓缩。Gonzales-Polo等^[60]也证实自噬体的形成在凋亡之前, 且这两条通路之间存在交叉性。有研究结果明显提示, 在出生后非洲刺毛鼠的卵母细胞只是经历了自噬性死亡^[41], 这可能由于不同的物种之间存在差异。

4.4 膜细胞自噬和卵泡发育

通过原位杂交发现MAP1LC3A mRNA在普通猪的膜细胞层表达水平高于小型猪, 但MAP1LC3A mRNA在颗粒细胞中的总体表达较弱。用RT-PCR和Real-time PCR分析发现, MAP1LC3A在膜细胞层的表达同样高于颗粒细胞层^[52]。大鼠的卵泡中, 发现在早期、中期和晚期发育中卵泡上的膜细胞, 其LC3蛋白的表达均较弱^[28], 因此膜细胞发生自噬在不同的物种中可能存在差异。在人类卵巢卵泡中Beclin-1表达于膜细胞, 而在颗粒细胞中未发现表达; 排卵后在黄体的膜黄体细胞和颗粒黄体细胞均发现了Beclin-1的表达, 可能参与黄体功能的调节^[61]。

4.5 香烟烟雾可能通过活性氧诱导的自噬作用导致卵巢早衰

卵巢功能早衰是产生不孕的重要因素, 环境中的有毒有害物质在某些特定阶段影响卵泡发育, 其中吸烟和暴露于香烟烟雾是其中重要的危险因素, 与女性生育力之间存在着重要的相关性, 能够使卵泡储备耗尽, 产生卵巢早衰^[62]。香烟烟雾中存在超过4 000种化学物质, 如多环芳烃族化合物(PAHs), 其可导致机体产生活性氧、自由基等, 可诱导氧化应激反应, 引起卵泡自噬和凋亡。小鼠暴露于香烟烟雾中使卵巢变小和原始卵泡数量减少, 可能是通过激活Bax途径而影响卵泡数量^[31, 63]。在体外培养大鼠卵泡过程中, 使用PAHs处理能够抑制卵丘扩张^[64]。香烟烟雾还可能通过影响自噬途径, 增加自噬体的数量和调控小鼠卵巢中关键基因的表达, 如

Beclin-1和LC3的表达增强调控自噬发生, 最终导致卵泡数量减少, 因此自噬途径可能是有毒物质导致卵泡减少的重要机制^[65]。

香烟烟雾可以诱导氧化应激、自噬途径的活化和锰超氧化物歧化酶的表达减弱, 从而改变线粒体的功能。长期暴露在香烟烟雾中, 可以导致机体的线粒体修复功能发生紊乱。凋亡过程中, 线粒体改造其嵴结构, 打开管状接头, 导致释放凋亡因子, 如细胞色素C, 激活凋亡途径。同时香烟烟雾使颗粒细胞中的自噬体增多, 线粒体形态发生改变。使颗粒细胞发生自噬而引起卵泡丢失。香烟烟雾能导致线粒体功能障碍, 是因为它可引起PARK2(使线粒体碎片化)表达增强以及线粒体融合蛋白MFN1和MFN2等下游的靶向分子表达下降。同时香烟烟雾使卵巢中自噬体增加, 自噬启动关键因子Beclin-1和LC3基因与蛋白表达增加, 同时自噬拮抗因子Bcl-2表达下降, 导致自噬活动增强^[31]。

5 展望

青春期前的卵巢是一个极富活力的器官, 99%以上的卵泡通过卵泡闭锁的过程而消失, 因而通过抑制卵泡闭锁从而改善女性生殖能力具有实际临床意义。如果这些卵泡能在体外培养生长而获得挽救, 那将带来巨大的益处, 能为牲畜生产、人类和家畜, 以及濒危物种提供丰富的配子, 而自噬途径可能为相关技术发展奠定理论基础。

自噬发生在任何发育阶段的卵泡中, 但在不同的发育阶段其在卵母细胞、颗粒细胞及膜细胞中的作用机制可能存在差异, 不同的物种间可能也存在着差异, 腔前卵泡的自噬可能主要在卵母细胞, 而有腔卵泡自噬主要是发生在哺乳动物卵巢颗粒细胞中, 与细胞凋亡密切相关。在卵泡发育的各个阶段, 自噬可能在卵巢卵泡发育过程中直接决定卵泡的命运(闭锁或是排卵), 但是目前有关自噬在卵巢发育过程中作用的研究报道非常少, 众多的具体机制并没有完全被阐明, 值得深入研究。在卵泡发育过程中, 无论是PI3K/PKA/mTOR, 还是钙信号和线粒体、细胞骨架等动态变化, 均发挥着非常重要的作用, 而这些因素同时调节自噬。探索已知的影响卵泡发育和闭锁的途径与自噬间的关系, 不仅将加深对卵泡发育机制的认识, 同时也将为卵巢早衰、卵巢癌等的深入研究奠定基础, 研究结果将为女性不孕不育

的原因探索提供理论依据。

参考文献 (References)

- 1 Reggiori F, Klionsky DJ. Autophagy in the eukaryotic cell. *Eukaryotic Cell* 2002; 1(1): 11-21.
- 2 Lockshin RA, Zakeri Z. Apoptosis, autophagy, and more. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36(12): 2405-19.
- 3 Shoji-Kawata S, Sumpter R, Leveno M, Campbell GR, Zou Z, Kinch L, *et al.* Identification of a candidate therapeutic autophagy-inducing peptide. *Nature* 2013; 494(7436): 201-6.
- 4 Brech A, Ahlquist T, Lothe RA, Stenmark H. Autophagy in tumour suppression and promotion. *Mol Oncol* 2009; 3(4): 366-75.
- 5 李华顺. AMPK和mTOR的自噬姻缘. *中国细胞生物学学报(Li Huashun. Autophagy relationship between AMPK and mTOR. Chinese Journal of Cell Biology)* 2011; 33(3): 336.
- 6 Alonso S, Pethe K, Russell DG, Purdy GE. Lysosomal killing of Mycobacterium mediated by ubiquitin-derived peptides is enhanced by autophagy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(14): 6031-6.
- 7 Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: An innocent convict. *J Clin Invest* 2005; 115(10): 2679-88.
- 8 孙玉涛, 徐立红. 自噬及其在癌细胞中作用机制的研究. *中国细胞生物学学报(Sun Yutao, Xu Lihong. The study on autophagy and its significance in cancer. Chinese Journal of Cell Biology)* 2012; 34(6): 604-10.
- 9 汪宇, 周桃, 孙韩艳, 黄蓓. 姜黄素类似物EF24诱导A549细胞自噬及凋亡关系的研究. *中国细胞生物学学报(Wang Yu, Zhou Tao, Sun Hanyan, Huang Bei. Study on the relationship between autophagy and apoptosis in A549 cells induced by curcumin analogue EF24. Chinese Journal of Cell Biology)* 2012; 34(6): 590-6.
- 10 陈科, 程汉华, 周荣家. 自噬与泛素化蛋白降解途径的分子机制及其功能. *遗传(Chen Ke, Cheng Hanhua, Zhou Rongjia. Molecular mechanisms and functions of autophagy and the ubiquitin-proteasome pathway. Yi Chuan)* 2012; 34(1): 5-18.
- 11 马泰, 孙国平, 李家斌. 细胞自噬的研究方法. *生物化学与生物物理进展(Ma Tai, Sun Guoping, Li Jiabin. Methods for autophagy detection. Progress in Biochemistry and Biophysics)* 2012; 39(3): 204-9.
- 12 Rabinowitz JD, White E. Autophagy and metabolism. *Science* 2010; 330(6009): 1344-8.
- 13 Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda t, *et al.* LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *EMBO J* 2000; 19(21): 5720-8.
- 14 Cao Y, Klionsky DJ. Physiological functions of Atg6/Beclin 1: A unique autophagy related protein. *Cell Res* 2007; 17(10): 839-49.
- 15 Yi C, Ma M, Ran L, Zheng J, Tong J, Zhu J, *et al.* Function and molecular mechanism of acetylation in autophagy regulation. *Science* 2012; 336(6080): 474-7.
- 16 Lin SY, Li TY, Liu Q, Zhang CX, Li XT, Chen Y, *et al.* GSK3-TIP60-ULK1 Signaling Pathway Links Growth Factor Deprivation to Autophagy. *Science* 2012; 336(6080): 477-81.
- 17 Burbulla L F, Krebichl G, Krüger R. Balance is the challenge—the impact of mitochondrial dynamics in Parkinson's disease. *Eur J*

- Clin Invest 2010; 40(11): 1048-60.
- 18 Kim I, Rodriguez-Emiquez S, Lemasters JJ. Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch Biochem Biophys* 2007; 462(2): 245-53.
- 19 刘丹慧, 吕建新. 线粒体自噬的研究进展. *细胞生物学杂志*(Liu Danhui, Lu Jianxin. Progress in mitophagy. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2008; 30(4): 467-71.
- 20 Wolfdieter S, Philipp JK. Regulation of PINK1-Parkin-mediated mitophagy. *Autophagy* 2011; 7(3): 266-78.
- 21 李清华, 肖福英. 线粒体自噬最新研究进展. *国际遗传学杂志*(Li Qinghua, Xiao Fuying. Advances in the regulation of mitophagy. *International Journal of Genetics*) 2012; 35(1): 10-20.
- 22 Harr MW, Distelhorst CW. Apoptosis and autophagy: Decoding calcium signals that mediate life or death. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; 2(10): a005579.
- 23 Hoyer-Hansen M, Bastholm L, Szyniarowski P, Campanella M, Szabadkai G, Farkas T, *et al.* Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2. *Mol Cell* 2007; 25(2): 193-205.
- 24 Hamacher-Brady A. Autophagy regulation and integration with cell signaling. *Antioxid Redox Signal* 2012; 17(5): 756-65.
- 25 Shacka JJ, Klocke BJ, Roth KA. Autophagy, bafilomycin, cell death: the "a-Bcs" of plecomacrolide-induced neuroprotection. *Autophagy* 2006; 2(3): 228-30.
- 26 Hamasaki M, Yoshimori T. Where do they come from Insights into autophagosome information. *FEBS Lett* 2010; 584(7): 1296-301.
- 27 Kanzawa T, Germano IM, Komata T, Ito H, Kondo Y, Kondo S. Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death Differ* 2004; 11(4): 448-57.
- 28 Choi JY, Jo MW, Lee EY, Yoon BK, Choi DS. The role of autophagy in follicular development and atresia in rat granulosa cells. *Fertil Steril* 2010; 93(8): 2532-7.
- 29 Choi J, Jo M, Lee E, Choi D. Induction of apoptotic cell death via accumulation of autophagosomes in rat granulosa cells. *Fertil Steril* 2011; 95(4): 1482-6.
- 30 Escobar Sánchez ML, Echeverría Martínez OM, Vázquez-Nin GH. Immunohistochemical and ultrastructural visualization of different routes of oocyte elimination in adult rats. *Eur J Histochem* 2012; 56(2): e17.
- 31 Gannon AM, Stämpfli MR, Foster WG. Cigarette smoke exposure elicits increased autophagy and dysregulation of mitochondrial dynamics in murine granulosa cells. *Biol Reprod* 2013; 88(3): 63.
- 32 Jahreiss L, Menzies F M, Rubinsztein DC. The itinerary of autophagosomes: From peripheral formation to kiss-and-run fusion with lyso-somes. *Traffic* 2008; 9(4): 574-87.
- 33 Thoreen CC, Kang SA, Chang JW, Liu Q, Zhang J, Gao Y, *et al.* An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *J Biol Chem* 2009; 284 (12): 8023-32.
- 34 Sarkar S, Krishna G, Imarisio S, Saiki S, O'Kane CJ, Rubinsztein DC. A rational mechanism for combination treatment of Huntington's disease using lithium and rapamycin. *Hum Mol Genet* 2008; 17(2): 170-8.
- 35 Maiuri MC, Le Toumelin G, Criollo A, Rain JC, Gautier F, Juin P, *et al.* Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J* 2007; 26(10): 2527-39.
- 36 Sarkar S, Davies JE, Huang Z, Tunnacliffe A, Rubinsztein DC. Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and alpha-synuclein. *J Biol Chem* 2007; 282(8): 5641-52.
- 37 Sarkar S, Perlstein EO, Imarisio S, Pineau S, Cordenier A, Maglathin RL, *et al.* Small molecules enhance autophagy and reduce toxicity in Huntington's disease models. *Nat Chem Biol* 2007; 3(6): 331-8.
- 38 Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 2008; 132(1): 27-42.
- 39 Manabe N, Goto Y, Matsuda-Minehata F, Inoue N, Maeda A, Sakamaki K, *et al.* Regulation mechanism of selective atresia in porcine follicles: Regulation of granulosa cell apoptosis during atresia. *J Reprod Dev* 2004; 50(5): 493-514.
- 40 Orisaka M, Tajima K, Tsang BK, Kotsuji F. Oocytegranulosa-theca cell interactions during preantral follicular development. *J Ovarian Res* 2009; 2(1): 9.
- 41 Hulas-Stasiak M, Gawron A. Follicular atresia in the prepubertal spiny mouse (*Acomys cahirinus*) ovary. *Apoptosis* 2011; 16(10): 967-75.
- 42 Cardenas H, Pope WF. Control of ovulation rate in swine. *J Anim Sci* 2002; 80: 36-46.
- 43 成令忠, 钟翠平, 蔡文琴. 现代组织学. 上海: 上海科学技术文献出版社(Cheng Lingzhong, Zhong Cuiping, Cai Wenqin. *Contemporary Histology*. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers) 2003, 1005.
- 44 Matsuda-Minehata F, Inoue N, Goto Y, Manabe N. The regulation of ovarian granulosa cell death by pro- and anti-apoptotic molecules. *J Reprod Dev* 2006; 52(6): 695-705.
- 45 Morais RD, Thomé RG, Lemos FS, Bazzoli N, Rizzo E. Autophagy and apoptosis interplay during follicular atresia in fish ovary: A morphological and immunocytochemical study. *Cell Tissue Res* 2012; 347(2): 467-78.
- 46 Djavaheri-Mergny M, Maiuri MC, Kroemer G. Cross talk between apoptosis and autophagy by caspase-mediated cleavage of Beclin 1. *Oncogene* 2010; 29(12): 1717-9.
- 47 Zhang HY, Kong XX, Kang JS, Su J, Li Y, Zhong JT, *et al.* Oxidative stress induces parallel autophagy and mitochondria dysfunction in human Glioma U251 cells. *Toxicol Sci* 2009; 110(2): 376-88.
- 48 Lerner AE, Bialik S, Simon HU, Kimchi A. Life and death partners: Autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ* 2009; 16(7): 966-75.
- 49 Edinger AL, Thompson CB. Death by design: Apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16(6): 663-9.
- 50 Boya P, Gonzalez-Polo RA, Casares N, Perfettini JL, Dessen P, Larochette N, *et al.* Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol* 2005; 25(3): 1025-40.
- 51 Szołtys M, Słomczyńska M, Wojtowicz A, Pierściński A. Subpopulations of the granulosa layer differentiated by histo- and immunocytochemical methods in the preovulatory follicle of the rat. *Folia Histochem Cytobiol* 1999; 37(2): 91-2.
- 52 Sang H Kim, Sue Y Hwang, Kwan S Min, Jong T Yoon. Molecular cloning and expression analyses of porcine MAP1LC3A in the granulosa cells of normal and miniature pig. *Reprod Biol Endocrinol* 2013; 11: 8.

- 53 Duerschmidt N, Zabirnyk O, Nowicki M, Ricken A, Hmeidan FA, Blumenauer V, *et al.* Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1-mediated autophagy in human granulosa cells as an alternative of programmed cell death. *Endocrinology* 2006; 147(8): 3851-60.
- 54 Tsukamoto S, Kuma A, Murakami M, Kishi C, Yamamoto A, Mizushima N. Autophagy is essential for preimplantation development of mouse embryos. *Science* 2008; 321(5885): 117-20.
- 55 Tingen CM, Bristol-Gould SK, Kiesewetter SE, Wellington JT, Shea L, Woodruff TK. Prepubertal primordial follicle loss in mice is not due to classical apoptotic pathways. *Biol Reprod* 2009; 81(1): 16-25.
- 56 Devine PJ, Payne CM, McCuskey MK, Hoyer PB. Ultrastructural evaluation of oocytes during atresia in rat ovarian follicles. *Biol Reprod* 2000; 63(5): 1245-52.
- 57 Rodrigues P, Limback D, McGinnis LK, Plancha CE, Albertini DF. Multiple mechanisms of germ cell loss in the perinatal mouse ovary. *Reproductio* 2009; 137(4): 709-20.
- 58 Escobar ML, Echeverria OM, Ortiz R, Vasquez-Nin GH. Combined apoptosis and autophagy, the process that eliminates the oocytes of atretic follicles in immature rats. *Apoptosis* 2008; 13(10): 1253-66.
- 59 Ortiz R, Echeverria OM, Salgado R, Escobar ML, Vasquez-Nin GH. Fine structural and cytochemical analysis of the process of cell death of oocytes in atretic follicles in newborn and prepubertal rats. *Apoptosis* 2006; 11(1): 25-37.
- 60 Gonzales-Polo R, Boya P, Pauleau A, Jalil P, Larochette N, Souquere S, *et al.* The apoptosis/autophagy paradox: Autophagic vacuolization before apoptotic death. *J Cell Sci* 2005; 118(Pt 14): 3091-102.
- 61 Gaytán M, Morales C, Sánchez-Criado JE, Gaytán F. Immunolocalization of beclin 1, a bcl-2-binding, autophagy-related protein, in the human ovary: Possible relation to life span of corpus luteum. *Cell Tissue Res* 2008; 331(2): 509-17.
- 62 Soares SR, Simon C, Remohi J, Pellicer A. Cigarette smoking affects uterine receptiveness. *Hum Reprod* 2007; 22(2): 543-7.
- 63 Tuttle AM, Stampfli M, Foster WG. Cigarette smoke causes follicle loss in mice ovaries at concentrations representative of human exposure. *Hum Reprod* 2009; 24(6): 1452-9.
- 64 Neal MS, Zhu J, Holloway AC, Foster WG. Follicle growth is inhibited by benzo-[a]-pyrene, at concentrations representative of human exposure, in an isolated rat follicle culture assay. *Hum Reprod* 2007; 22(4): 961-7.
- 65 Gannon AM, Stampfli MR, Foster WG. Cigarette smoke exposure leads to follicle loss via an alternative ovarian cell death pathway in a mouse model. *Toxicol Sci* 2012; 125(1): 274-84.