

环鸟苷酸对卵巢细胞功能的调控

周振琪 潘玲梅 王恬* 石放雄*

(南京农业大学动物科学技术学院, 南京 210095)

摘要 环鸟苷酸(cGMP)是一种具有广泛生物学活性的环核苷酸。尽管 cGMP 作为第二信使, 在调控卵巢细胞功能中发挥着广泛而重要的作用早有报道, 但直至近年, cGMP 在生殖活动中的重要作用才受到人们的关注, 而成为生殖科学研究领域的热点之一。卵巢是雌性动物的重要器官, 而 cGMP 在卵巢细胞中起着多方面的调节作用。现对卵巢内 cGMP 的来源, cGMP 在卵巢内抑制雌激素(E₂)的合成、LH 受体表达、卵泡闭锁的作用, 以及 cGMP 的作用机制等方面的研究进展进行综述。

关键词 环鸟苷酸; 卵巢; 类固醇细胞; LH 受体; 颗粒细胞

环鸟苷酸(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)作为一种第二信使物质, 参与卵巢细胞多方面功能性的调节, 近年来, 有关 cGMP 调控卵巢功能方面的研究进展较快, 并已成为了生殖生物学的研究热点之一。

1 卵巢内 cGMP 的来源

人类及动物体内的 cGMP 由鸟苷三磷酸(GTP)在鸟苷酸环化酶(GC)的作用下转变而成。GC 广泛存在于包括卵巢等的各机体组织中^[1]。在许多组织的胞浆中存在两种 GC: 可溶性 GC(sGC)和与膜结合的 GC(mGC)。

膜结合性鸟苷酸环化酶(mGC)为一跨膜蛋白, 由三部分组成: 细胞外的配体结合结构域、跨膜结构域、细胞内催化结构域。其中配体结合结构域具有特异性结合配体的作用, 按其结合配体的特异性可分为 mGC-A、mGC-B 和 mGC-C。mGC-A 为 A 型利钠肽的受体, 与心房利钠肽(ANP)或脑利钠肽(BNP)结合, mGC-B 为 B 型利钠肽受体, 被 C 型利钠肽(CNP)选择性激活^[2]。Noubani 等^[3]报道, 卵巢内产生的肽类激素主要是 CNP, 卵巢细胞表达的主要是 mGC-B 受体。

可溶性鸟苷酸环化酶(sGC)是由约 80 kDa 的 α 亚基和约 70 kDa 的 β 亚基组成的异二聚体, 含有辅基血红素^[1]。用荧光免疫细胞化学和 Western 印迹探讨新生大鼠和 eCG-hCG 诱导的未成熟大鼠模型的卵巢和体外培养的未成熟颗粒细胞中的 sGC 的 α 和 β 亚基的表达, 发现 sGC 的 α 和 β 亚基主要分布于原

始卵泡和初级卵泡的颗粒细胞和外膜细胞中, 并随卵泡的生长, 颗粒细胞中的表达水平下降, 提示 cGMP 在调节颗粒细胞的分裂和阻止细胞周期的进程中起作用^[4]。研究表明 sGC 和 mGC 不同, sGC 不直接受细胞均浆中激素的刺激。一般认为, sGC 的活性需要一氧化氮(NO)的激活。在 Chen 等^[5]的研究中发现 NO 与 sGC 中血红素基团上的铁离子具有高亲和力, NO 与 sGC 结合形成亚硝基复合物, 激活 sGC, 使 cGMP 增加。研究还证实 CO 也能激活 sGC 的活性^[6-8]。

2 cGMP 对卵巢功能的调控

2.1 对卵巢性腺类固醇激素分泌的调节

卵巢分泌的性腺类固醇激素主要为雌激素(E₂)和孕酮(P), 实验证实 cGMP 能调节雌激素的合成。在人黄体化的颗粒细胞内存在着合成 NO 的同工酶, 用 NO 供体处理后, 发现 cGMP 合成上升, 并抑制雌激素的合成。然而, 早年的这一实验用 cGMP 类似物处理, 其雌激素合成并无任何影响。此后的一些研究均未能证实 cGMP 类似物对雌激素的合成具有抑制作用^[9,10]。然而, LaPolt 等^[11]在使用超氧化物歧化酶(SOD)处理大鼠颗粒细胞体外培养模型实验时, 发现 SOD 可以强烈地抑制 FSH 和毛喉素所激活的腺苷酸环化酶活性, 有抑制雌激素合成的作

收稿日期: 2005-04-07 接受日期: 2005-06-13

国家重点基础研究发展规划项目(973 计划)(No.2004CB117500)和南京农业大学高层次人才引进基金(No.804002)资助

* 通讯作者。王恬: Tel/Fax: 025-84395314, E-mail: tianwang@njau.edu.cn; 石放雄: Tel/Fax: 025-84399112, E-mail: fxshi@njau.edu.cn

用,并伴随 cGMP 急剧增加。Moncada 等^[12]的研究发现, SOD 有增强 NO 刺激 cGMP 生成的作用。LaPolt 等^[11]的实验进一步证明: cGMP 类似物可以模拟 SOD 对雌激素的抑制作用,证实 cGMP 对卵巢雌激素的合成有抑制作用。Ishimaru 等^[9]在大鼠颗粒细胞体外培养模型中,发现 cGMP 类似物可同样模拟 NO 促进剂对雌激素合成的抑制作用,进一步确认了 cGMP 类似物对雌激素合成的抑制作用。Grasselli 等^[10]的研究表明,在猪的颗粒细胞内, cGMP 类似物可以有效地抑制雌激素的合成。Tafuya 等^[13]进一步确证了 cGMP 对于雌激素的抑制作用,这些研究发现,用 YC-1 处理的颗粒细胞中,内源性 sGC 活化,使 cGMP 浓度上升,却会抑制 E₂ 和 cAMP。

2.2 对促黄体生成素受体(LHR)表达的影响

促黄体生成素受体(LHR)的表达是颗粒细胞成熟的重要标志之一。在生长卵泡的颗粒细胞内起初缺乏 LHR,在 FSH 的作用下, LH 受体才开始表达^[11]。为证实 cGMP 是否可影响 LHR 表达, Piquette 等^[14]在大鼠颗粒细胞体外模型中分别来用 NO 供给体(ETA/NO)和一个充满 cGMP 类似物的培养液处理颗粒细胞,随后用 Western 印迹来观察对 FSH 促进 LHR 浓度的影响,发现 ETA/NO 可抑制 LHR 转录的启动,并且 cGMP 类似物可模拟 NO 对 LH 受体表达的抑制作用。进一步的研究证实, NO 和 cGMP 类似物可以有效地抑制 FSH 对 LHR 表达的促进作用,而且这些因子是作用于 FSH 受体后的位点来抑制 LHR mRNA 浓度。虽然 NO 和 cGMP 可以通过抑制 FSH,刺激 cAMP 的增加,使 cAMP 依赖性的 FSH 受体表达受阻^[9],但 cGMP 抑制 LHR 表达的确切机制还有待进一步研究。

2.3 对细胞凋亡和卵泡闭锁的影响

许多研究表明,卵泡闭锁是卵泡细胞凋亡的结果,即凋亡是卵泡闭锁的机制。在每一个排卵周期中,数个卵泡会从众多的原始卵泡中征募出来,经历腔前卵泡、小的有腔卵泡、大的有腔卵泡到最后的成熟卵泡。在一个排卵周期中,有许多的卵泡被征募,开始生长,但是只有极少比例的卵泡可以持续发育成为成熟卵泡,其他未发育到最后的卵泡则自行闭锁。

Hsueh 等^[15]利用体外卵泡培养系统以探索决定发育卵泡存活和闭锁的因子。Chun 等^[16]正是通过这种方法,发现用 NO 促进剂处理早期的有腔卵泡,

可以减少细胞的凋亡。而 NO 的抗凋亡作用可用 cGMP 类似物处理来模拟,即 NO 可通过 cGMP 来抑制卵泡凋亡。Mcgee 等^[17]在腔前卵泡和 Chun 等^[18]在成熟卵泡用 cGMP 类似物处理,发现了相似的结果,暗示了 cGMP 对各级卵泡都有抗闭锁作用。

2.4 影响卵巢的自分泌和旁分泌

由 NO 激活 sGC 使 cGMP 量增加从而影响类固醇激素的合成和分泌的机制。了解 NO/cGMP 依赖的信使途径对卵巢功能的调节作用,有助于对卵巢的自分泌和旁分泌的理解^[11]。许多研究都表明了白介素 1-β 是通过 NO 来对卵泡生存发育,排卵和类固醇激素起调节作用的^[18~22];另外,肿瘤坏死因子(TNF-α)可增加卵巢中 NO 的量^[21,23]。但现在还没有证据证明肿瘤坏死因子可通过 NO 或 cGMP 影响卵巢功能。有关卵巢类固醇激素和 cGMP 依赖的信使途径的互作,Chen 等^[24]和 Ropero 等^[25]发现在其他一些组织中 E₂ 会刺激 mGC 增加 cGMP 的含量。Sirotkin 等^[26]对人卵巢颗粒细胞的研究表明孕酮对 cGMP 的浓度的增加有刺激作用。这些研究结果表明,卵巢类固醇激素会作用在卵巢或其他组织上,从而引起 cGMP 的量变化而发挥作用。

3 cGMP 的作用机制

尽管 cGMP 对卵巢功能有着重要的生物学作用早已证实,但在生物化学和分子生物学水平的研究则很少。一般来说,在细胞中 cGMP 是通过一些个别的信使途径来诱导细胞生物学应答(图 1)^[11]。

3.1 激活 PKG

cGMP 活性最一般的表达途径就是通过 PKG 来调控。PKG 有两种类型:PKG-I 和 PKG-II。在细胞内,PKG 使底物磷酸化而产生生物学效应。cGMP 通过各种不同的途径来抑制细胞质中 Ca²⁺ 浓度(包括抑制 Ca²⁺ 通道流量);1,4,5-三磷酸环己醇受体磷酸化和通过受磷蛋白(phospholamban)的磷酸化来对从内质网释放出来的 Ca²⁺ 实施调节^[27~29]。Li 等^[30]的研究同样地证实了 NO/cGMP 对细胞内 Ca²⁺ 浓度的调节作用。迄今为止,有关卵巢中 PKG 表达调控方面的信息还知之甚少。Orstavik 等^[31]指出,尽管对卵泡各周期的不同阶段都进行了细致的分析研究,但 PKG-II 的表达很弱,甚至在人卵巢中并不存在。相反,他们发现在卵巢中 PKG-I 浓度却较高^[31]。但目前仍缺乏有关 PKG-I 在卵巢中表达调控的研究报道。

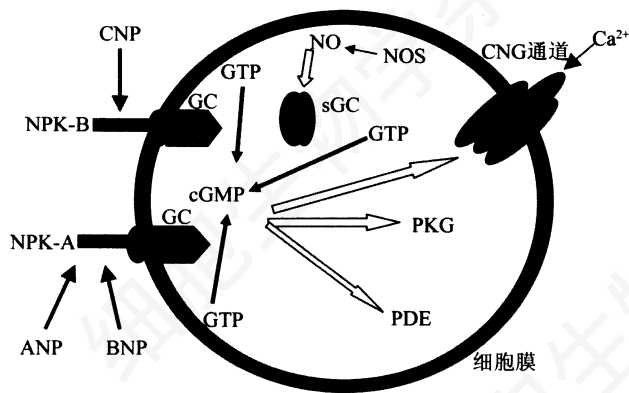


图1 细胞中cGMP诱导细胞生物学应答的信使途径^[1]

细胞内cGMP主要通过mGC和sGC两种途径实现对细胞生物学应答的诱导。mGC又有两种方式：①CNP与膜上的B型利钠肽受体(NPK-B)结合，通过mGC使细胞内GTP转变成cGMP；②ANP, BNP与膜上的A型利钠肽受体(NPK-A)结合，通过mGC使细胞内GTP转变成cGMP。sGC途径为NO通过刺激sGC使细胞内GTP转变成cGMP。在细胞内生成的cGMP有三种作用：调控环状核苷酸门控通道(cyclic nucleotide-gated ion channel, CNG)；调节磷酸二酯酶(PDE)活性；激活蛋白激酶G(PKG)。

一些研究表明，在cGMP/PKG和cAMP依赖性通道间存在内在的协同作用和拮抗作用。最近的研究表明，PKG能使cAMP应答结合蛋白(CREB)磷酸化，而且NO对fos基因刺激的作用依赖这一生化作用^[32]。Lu等^[33]的研究证明了在海马体内NO对CREB磷酸化的作用也受到PKG的调节。Forte等^[34]和Chao等^[35]报道了热稳定内毒素对小肠氯化物部分的作用是通过cGMP对蛋白激酶A(PKA)的调节而实现的。因此，高浓度cGMP的累积肯定会影响PKA的活性，进而影响细胞的生物学功能。

3.2 调控离子通道

研究表明，PKG会调节细胞质中Ca²⁺的浓度，同时cGMP也可以直接影响到环状核苷酸门控通道(CNG)。CNG是一阳离子通道，它允许Ca²⁺流入细胞^[36]。cGMP对CNG的通道直接影响主要表现在对血管系统的调控。cGMP结合在CNG通道上，使通道开放，结果会增加Ca²⁺的内流，使细胞去极化，这与上文所述PKG会抑制细胞质中Ca²⁺浓度的作用刚好相反。McCoy等^[37]发现cGMP抑制肾中CNG通道开放。在cGMP和Ca²⁺依赖细胞信使途径与细胞功能间的作用在不同组织间有很大的差异和特异性。Weyand等^[38]和本实验室的研究发现CNG的同型体在睾丸中有表达^[39]，在卵巢中CNG通道的调控表达的研究报告还很少。有关卵巢中CNG通道

对细胞内信使的调控作用还有待深入研究。

3.3 调节磷酸二酯酶(PDE)活性

PDE蛋白家族可通过催化cGMP和/或cAMP水解而调节cAMP与cGMP的水平，进而使蛋白质磷酸化发生改变而干预信使转导过程，而PDE本身也受到cGMP和cAMP的调节。cGMP对细胞信号的影响可通过调节PDE而实现。Mehats等^[40]发现PDE有11个已知的家族。因此，环磷酸核苷的浓度不仅依赖于环化酶的活性，而且同时也受PDE的表达和活性的影响。Conti等^[41]发现一有趣的现象：PDE2可被cGMP激活，然而PDE3则被cGMP所抑制。在一些细胞中cGMP和cAMP有协同作用，PDE3被NO和cGMP所抑制引起cAMP浓度的上升及cAMP依赖信使途径的增强^[42-44]；相反，MacFarland等^[45]发现在另一些细胞中，NO和cGMP会增强PDE2的活性，从而促进cAMP水解而对cAMP依赖信使途径产生抑制作用。cGMP对PDE浓度的影响将决定NO, cGMP和cAMP间的作用是协同作用还是抑制作用，但这些将取决于cGMP对在特定组织中PDE浓度的影响。尽管现在已经清楚，卵子中表达PDE3而颗粒细胞中表达cAMP特异性的PDE4，但对PDE特征性表达的研究在卵巢中尚不完全。此外，在卵巢中，关于PDE2的表达还没有报道。很明显，作为依赖性cGMP信使的PDE其他成员对卵巢功能的影响还有待深入研究。

4 小结

cAMP作为第二信使在卵巢中受到促性腺激素的调控，一些仍在完善中的理论同时也证明了cGMP对卵巢功能有着十分重要的作用。在卵巢中，有关调控cGMP依赖性信使通道作用机理的报道还十分罕见，特别是GC的表达调控及其降解过程，有待进一步深入研究。

参考文献(References)

- [1] Koesling D et al. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 1999, 135: 41
- [2] Schulz S et al. *Vitam Horm*, 1999, 57: 123
- [3] Noubani A et al. *Endocrinology*, 2000, 141: 551
- [4] Shi F et al. *Biol Reprod*, 2004, 70: 1552
- [5] Chen YH et al. *Fertil Steril*, 2003, 79: 687
- [6] Middendorff R et al. *Biol Reprod*, 2000, 63: 651
- [7] Christova T et al. *Acta Physiol Pharmacol Bulg*, 2000, 25: 9
- [8] Steiner AA et al. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2001, 280: R448

- [9] Ishimaru RS *et al. J Endocrinol*, 2001, **168**: 249
- [10] Grasselli F *et al. Domest Anim Endocrinol*, 2001, **20**: 241
- [11] LaPolt PS *et al. Reprod Biomed Online*, 2003, **6**: 15
- [12] Moncada S *et al. Proc Nat Acad Sci USA*, 1986, **83**: 9164
- [13] Tafoya MA *et al. Fertil Steril*, 2004, **82**: 1154
- [14] Piquette GN *et al. Endocrinology*, 1991, **128**: 2449
- [15] Hsueh AJ *et al. Endocr Rev*, 1984, **5**: 76
- [16] Chun SY *et al. Endocrinology*, 1996, **137**: 1447
- [17] McGee E *et al. Endocrinology*, 1997, **138**: 2417
- [18] Chun SY *et al. Endocrinology*, 1995, **136**: 3120
- [19] Ellman C *et al. J Clin Invest*, 1993, **92**: 3053
- [20] Ben-Shlomo I *et al. Biol Reprod*, 1994, **51**: 310
- [21] Matsumi H *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 1998, **243**: 67
- [22] Tobai H *et al. J Obstet Gynaecol Res*, 2001, **27**: 53
- [23] Brunswig-Spickenheier B *et al. Biol Reprod*, 1997, **57**: 700
- [24] Chen ZJ *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 1998, **252**: 639
- [25] Ropero AB *et al. J Physiol*, 1999, **521**: 397
- [26] Sirotkin AV *et al. Cell Signal*, 1995, **7**: 61
- [27] Sumii K *et al. Circ Res*, 1995, **77**: 803
- [28] Komalavilas P *et al. J Biol Chem*, 1996, **271**: 21933
- [29] Karczewski P *et al. Basic Res Cardiol*, 1997, **92**: 37
- [30] Li SJ *et al. Acta Pharmacol Sin*, 2005, **26**: 323
- [31] Orstavik S *et al. Genomics*, 1997, **42**: 311
- [32] Gudi T *et al. Oncogene*, 2000, **19**: 6324
- [33] Lu YF *et al. J Neurosci*, 1999, **19**: 10250
- [34] Forte LR *et al. Am J Physiol*, 1992, **263**: C607
- [35] Chao AC *et al. EMBO J*, 1994, **13**: 1065
- [36] Broillet MC *et al. Ann N Y Acad Sci*, 1999, **868**: 730
- [37] McCoy DE *et al. Kidney Int*, 1995, **48**: 1125
- [38] Weyand I *et al. Nature*, 1994, **368**: 859
- [39] Shi F *et al. J Androl*, 2005, **26**: 258
- [40] Mehats C *et al. Trends Endocrinol Metab*, 2002, **13**: 29
- [41] Conti M *et al. Endocr Rev*, 1995, **16**: 370
- [42] Draijer R *et al. Circ Res*, 1995, **76**: 199
- [43] Gao Y *et al. J Appl Physiol*, 1998, **84**: 13
- [44] Kurtz A *et al. Proc Nat Acad Sci USA*, 1998, **95**: 4743
- [45] MacFarland RT *et al. J Biol Chem*, 1991, **266**: 136

Regulation of Ovarian Function by cGMP

Zhen-Qi Zhou, Ling-Mei Pan, Tian Wang*, Fang-Xiong Shi*

(College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract Cyclic guanosine monophosphate (cGMP) as one kind of cyclic nucleotides, plays important roles in various physiological processes. It was known that cGMP, as a second messenger, had a potential role in modulating ovarian functions in 1980s. However, the role of cGMP modulating ovarian functions has received considerably less attention. Ovary is an important organ in the female animal, and cGMP regulates a wide range of ovarian functions. This report reviews the production of cGMP, the inhibitory effect of cGMP on ovarian estradiol production, LH receptor expression and follicular atresia, and the mechanism of cGMP signalling.

Key words cGMP; ovary; nitric oxide; LH receptor; follicular atresia

Received: April 17, 2005 Accepted: June 13, 2005

This work was supported by the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program) (No.2004CB117500) and a Grant-in-Aid for Introduction of the Outstanding Scientist from Nanjing Agricultural University (No.804002)

*Corresponding author. Tian Wang: Tel/Fax: 86-25-84396314, E-mail: tianwang@njau.edu.cn

Fang-Xiong Shi: Tel/Fax: 86-215-84399112, E-mail: fxshi@njau.edu.cn