

干细胞因子在卵泡发育过程中的作用

洪俊君 王子玉 王 锋* 许 丹 武 杰 李中原

(南京农业大学动物胚胎工程技术中心, 南京 210095)

摘要 干细胞因子(stem cell factor, SCF)是酪氨酸激酶受体的配体。哺乳动物卵巢组织能表达 SCF, 它不仅能促进和诱导卵母细胞的发育, 并能调控卵泡细胞间的相互作用及激素的生成, 而且是卵泡发育过程中重要的旁分泌因子, 可能激活蛋白激酶 C(PKC)和有丝分裂原激活蛋白激酶的激酶(MEK)及 PI3 激酶途径信号分子等信号途径, 对卵泡发育起调节作用。

关键词 干细胞因子; 卵泡发育; 信号转导

哺乳动物卵巢中成千上万的原始卵泡静止于第一次减数分裂前期的双线期。这些处于静止状态的原始卵泡会分批分化成发育的初级卵泡, 但控制和激活这些原始卵泡与卵母细胞的机制尚不清楚。大量复杂的因素可能通过促进或抑制生长而直接影响早期卵泡的发育。越来越多的研究表明, 体内除性腺分泌的激素外, 另有一些分泌因素也可能影响、调控这一过程的发生。在众多的影响因素中, 干细胞因子(stem cell factor, SCF)是近年来研究较多的一个影响卵泡发育的分泌因子, 其与受体组成的 SCF/c-Kit 系统可能起着很重要的作用。现将 SCF 在卵泡发育过程中的作用及其信号转导途径作一综述。

1 SCF 的理化性质和基因控制

SCF 又称肥大细胞生长因子(mast cell factor, MCF)或青灰因子(steel factor, SLF), 是酪氨酸激酶受体的配体, 又可用 KL (ligand of c-Kit receptor, KL)表示。SCF 是一多效糖蛋白, 相对分子量为 25 000~36 000, 由原癌基因 c-Kit 编码。SCF 广泛存在于体内许多细胞中, 其形式有膜结合型(SCFm)和可溶型(SCFs)两种, 且 SCFm 较 SCFs 对激酶有更持久的激活作用。此外 SCFs 可能具有双重功效, 体外培养小鼠原始生殖细胞, 当 SCFm 不存在时, SCFs 与成纤维细胞生长因子-4(FGF-4)有相互促进作用; 而当 SCFm 存在时, SCFs 则抑制 FGF-4 的促有丝分裂能力。在人胚胎性腺和胎儿卵巢中, SCFm 和 SCFs 的比例还不清楚^[1]。SCF 主要由肥大细胞产生, 但在人卵巢的颗粒细胞、膜细胞、膜间质细胞上均有表达^[2]。SCF 通过与其受体 c-Kit 结合完成信号转导从而发挥其生理作用: 促进细胞的

增殖与分化^[3]; 在肥大细胞与造血细胞的发育和功能的表达、生殖细胞和黑色素细胞的发育过程中起关键作用。许多研究已经证实, SCF 在卵泡发育过程中起着重要的调节作用, 尤其是在早期卵泡阶段, 起着关键的诱导作用。

对 SCF 基因水平的研究发现, 人 SCF 基因位于 12 号染色体长臂 2 区。在小鼠, SCF 和 c-Kit 分别由 S1 和 W 位点的基因编码, S1 和 W 位点中任一位置突变都会引起胚胎发育异常、黑色素细胞生成缺陷及血细胞生成缺陷, 导致胚胎细胞不能分化、移行。S1 和 W 位点基因的剔除会造成原始生殖细胞的发育缺陷, 在缺少 S1 和 W 基因小鼠的生殖腺中几乎没有生殖细胞, 而且 S1 位点其他等位基因的变异也能引起原始卵泡生长的特异性缺陷。在大鼠, SCF 和 c-Kit 分别由 Mgf 和 c-Kit 基因编码, 且 c-Kit 基因变异影响着 c-Kit 的表达, 破坏了 SCF/c-Kit 间的相互作用, 从而导致颗粒细胞和含有卵母细胞的腔前卵泡发生改变, 引起卵母细胞的发育缺陷及继发不孕^[4]。SCF 的表达和基因水平的研究表明, 卵巢组织存在产生 SCF 的物质基础, 且 SCF 与卵泡发育有着极为密切的关系^[2]。

2 SCF 在卵泡发育中的作用

2.1 SCF 诱导启动早期卵泡的生长发育

卵泡的生长发育主要依靠促性腺激素的作用, 但近年来众多的研究表明, 卵巢局部产生的许多旁

收稿日期: 2005-12-23 接受日期: 2006-06-19

江苏省自然科学基金资助项目(No.BK2003075)

* 通讯作者。Tel: 025-84395381, Fax: 025-84395314, E-mail:

f_wang2001@sina.com

分泌因子也参与调节卵泡的发育。SCF/c-Kit 对诱导原始卵泡的发育和启动原始卵母细胞的增殖是必须的^[5,6]。SCF 能诱导培养 4 天的大鼠卵巢的原始卵泡发育^[7]。在新鲜的和培养 4 天的大鼠卵巢横切面见到大约 250~350 个卵泡，其中原始卵泡为 68%，发育卵泡为 32%。经 SCF 处理继续培养 4 天后，卵巢中每一横断面原始卵泡约占 17%，而发育卵泡约占 83%，且 c-Kit 抗体能阻断这一作用。该研究表明，SCF 是参与卵泡发育的启动因子，对原始卵泡发育有显著的诱导作用。SCF 也可以单独诱导卵母细胞的生长^[8]。取母鼠交配后 15.5~16.5 天的雌性胎儿，取出卵母细胞并除去其颗粒细胞层以减除缝隙连接的干扰作用。在添加 SCF 的培养基中培养 6 天，卵母细胞的直径显著大于未添加 SCF 培养基中的卵母细胞，表明 SCF 能促进卵母细胞的早期生长，诱导早期卵泡的发育，而且 SCF 的这一作用存在一定的剂量依赖性。可以推测，体内 SCF 在积存到一定量时诱导启动了卵泡的发育，且 SCF 量的多少与卵泡发育数目也存在一定的相关性。即如果体内 SCF 量过大可引起大量卵泡发育启动，对超数排卵可能有一定的帮助。而卵母细胞在体外培养 4 天后便停止了生长，且在后期与颗粒细胞共同培养后，SCF 处理组卵母细胞较对照组卵母细胞并无显著差异，即 SCF 并不能单独直接促进卵母细胞的后期生长发育。在胎鼠和胎羊卵巢，c-Kit mRNA 在增殖卵母细胞中表达很高，但在减数分裂启动时被抑制。当羊卵母细胞到达减数分裂双线期时，c-Kit 表达急剧下降，并且在原始卵泡中停止分泌。提示 SCF 在卵母细胞减数分裂时不起或起很小的作用，且物种间存在一定的差异^[9]，但其停止表达的机制还不明确。然而在提纯的膜细胞上可以检测到 c-Kit mRNA 的表达，且大、中、小卵泡均表达 SCF 和 c-Kit mRNA，说明 SCF 及 c-Kit 基因的表达可能贯穿于卵泡发育的整个过程，但其表达可能需要其他一些因子的介导或协同^[6]。c-Kit/SCF 系统在早期未出生小鼠卵巢中与其他一些生长因子的相互作用已有报道。碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和 SCF 只有在同时激活时才能最大限度地促进原始卵泡向初级卵泡的转换^[10]；在小鼠卵母细胞与颗粒细胞共培养体系中，卵母细胞促进因子骨骼形态发生蛋白(BMP)-15，刺激颗粒细胞中 SCF 的表达，后者则抑制前者在卵母细胞中的表达，从而形成一个负调控环^[11]。

2.2 SCF 与卵泡细胞的关系

在卵泡发育过程中，生长的卵母细胞逐渐合成透明带糖蛋白，积累 RNAs 和蛋白质，并与卵母细胞形成缝隙连接，以获得代谢物质和调控信号而生长，SCF 可能是其中的一个信号分子。人卵巢中的颗粒细胞、膜细胞及间质细胞均表达 SCF，而卵母细胞表达 c-Kit^[12]。在牛，颗粒细胞表达 SCF，卵母细胞表达 c-Kit；体外培养时，SCF/c-Kit 对卵母细胞的存活和发育也起了重要作用。表明卵母细胞分泌的 SCF 可能通过缝隙连接直接作用于卵母细胞促进其生长。此外，在人卵巢的颗粒细胞及膜细胞上也均检测到了 c-Kit 的表达，表明 SCF 可能直接作用于膜细胞和颗粒细胞，调控其生长分化并分泌多种生长因子从而间接调控卵母细胞的生长发育^[12]。而且在颗粒前体细胞和原始卵泡第一次形成的颗粒细胞中 SCF 染色明显，表明自分泌机制在颗粒细胞形成的启动中起关键作用，可能还受到卵母细胞启动的生长分化因子(GDF)-9 的协助^[13,14]。且颗粒细胞分泌的 SCF 显著增加了早期卵泡周围卵泡膜细胞层的数目，促进了卵泡的健康发育^[15]。所以 SCF 可能促进了未分化间质干细胞向卵泡膜细胞的分化，调控卵母细胞间的相互作用，从而促进卵泡的进一步发育。

2.3 SCF 与激素的关系

卵泡发育是一个极为复杂的过程，在这一过程中许多因素都起着重要的调控作用，类固醇激素就是其中之一，对卵泡的后期发育是必须的，且其作用机制已经比较清楚。SCF 在卵泡发育中能直接刺激卵泡膜细胞的生长和类固醇激素的产生。SCF/c-Kit 系统可调节类固醇激素的合成及卵泡腔的形成^[16]。在游离血清中培养分离的牛卵泡膜内层细胞，当细胞处于次融合状态时，SCF 能刺激卵泡膜细胞分泌雄激素。而在大的腔前卵泡中，SCF/c-Kit 系统不仅调节了卵母细胞胞质成熟而且使卵泡膜细胞产生雄激素的量达到最大^[15]。体内的雄激素经颗粒细胞的芳香化作用可转化成 E₂，其水平与卵泡液中 SCF 浓度成显著相关，且 SCF 水平高的卵巢中，其卵泡发育也较好，可能是因为 SCF 调控了类固醇激素的分泌，从而促进了卵母细胞的生长发育。前面提到 SCF 并不能直接促进卵母细胞的后期发育，但 SCF 在大、中、小卵泡中均有表达，表明 SCF 在卵母细胞后期发育中可能通过调节一些直接作用于卵母细胞的因子或激素来实现其对卵泡发育的调

控。在动物中, SCF 与促卵泡激素(follicle stimulating hormone, FSH)之间, 通过相互的调节和影响, 彼此促进, 从而影响卵泡的发育^[17]。且 FSH 对 SCF 表达的调控存在双向性: 低浓度 FSH 可以降低 SCFs/SCFm 的比例, 而高浓度 FSH 提高了 SCFs/SCFm 的比值。且低 SCFs/SCFm 比值可以促进卵母细胞的生长^[18]。在人卵泡液中, SCF 与 FSH 的作用也是相辅相成的, 且在超排中 SCF 和促性腺激素在促进卵泡发育过程中可能有协同作用^[11]。可见, SCF 通过调节类固醇激素的分泌水平, 对优势卵泡的发育、排卵起关键的调控作用, SCF 水平过高或不足均有可能破坏正常卵泡的发育机制, 引起生殖疾病。

3 SCF 调节卵泡发育过程中的信号转导机制

SCF 在卵泡发育过程中的作用已经比较明确, 但其具体的作用机制并不十分清楚。体外培养出生当天的小鼠卵巢时, 添加蛋白激酶 C(PKC)抑制剂 GF109203X 和有丝分裂原激活蛋白激酶的激酶 (MEK)抑制剂 U0126 显著改变了 SCF 处理组卵巢中不同卵泡类型的数目, 同时发现 PKC 激活剂豆蔻酰佛波醇乙酯(PMA)和 SCF 一样也能改变不同卵泡类型的数目。免疫印迹法检测发现, SCF 显著提高了 Erk1/ Erk2 的磷酸化水平, 而 GF109203X 可以将由 SCF 引起的磷酸化 Erk1/Erk2 表达的增高回复到正常水平。将 PMA 处理组的磷酸化 Erk1/ Erk2 水平与 SCF 处理组进行比较, 可以观察到相同的增加量。免疫印迹法测量增殖细胞核抗原(PCNA)检测颗粒细胞的增殖以间接反映 SCF 对卵泡发育的作用, 发现 SCF 显著提高了 PCNA 的表达。PMA 与 SCF 相似, 也能提高 PCNA 的表达, 而 GF109203X 和 U0126 则降低了由 SCF 诱导的 PCNA 的表达。可见, SCF 很可能通过激活 PKC 和 MEK 途径对卵泡发育起调节作用^[18]。

Reddy 等^[19]在新生小鼠、大鼠卵母细胞首次检测到 PI3 激酶途径的信号分子, 即促进细胞增殖和生存的丝氨酸/苏氨酸激酶 Akt(PKA), 以及引起细胞凋亡和抑制细胞周期的转录因子 Akt 基质 FKHRL1。利用卵母细胞体外培养体系, 发现卵母细胞的启动因子 Akt 和 FKHRL1 由 SCF 调控。用 SCF 处理培养的卵母细胞不仅能快速地磷酸化和激活 Akt, 并且同时使 FKHRL1 磷酸化从而可能功能性地

抑制 FKHRL1。利用原位杂交和免疫组化技术发现, Akt 和 FKHRL1 主要在原始和初级卵泡卵母细胞上表达, 并且 FKHRL1 基因缺陷小鼠出现原始卵泡过度增殖到初级卵泡的现象, 而且卵泡体积过度增大, 据此推测, 颗粒细胞分泌的 SCF 在原始卵泡向初级卵泡的转换以及卵泡的后继发育过程中的作用可能包括卵母细胞 Akt 的激活和 FKHRL1 的抑制。卵母细胞中 Akt 可能促进卵泡发育, 而 FKHRL1 可能起抑制卵泡发育的作用。这些结果提示, SCF-Kit-PI3 激酶-Akt-FKHRL1 信号通道可能在调控哺乳动物卵母细胞生长率和卵巢卵泡的激活及早期发育中起重要作用。Jin 等^[20]的试验也证明了这一通路的作用。体外培养发现, SCF 可以显著降低卵母细胞的凋亡率, 添加 PI3 激酶抑制剂可以抑制 SCF 的抗凋亡作用, 且 SCF 可以提高 PI3 激酶特异性底物 Akt 的磷酸化水平。同时, SCF 正向调控 Bcl-2 家族蛋白(凋亡相关蛋白)中的抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bcl-x1, 负向调控凋亡前因子 Bax。而 PI3 激酶抑制剂可以逆转这一调控作用。可见卵泡中 SCF 与 c-Kit 结合后, 通过 PI3 激酶途径调节卵母细胞的凋亡, 从而间接调控卵泡的发育。Liu 等^[21]的实验亦表明, 颗粒细胞分泌的 SCF 与卵母细胞表面的 c-Kit 及卵母细胞 PI3 激酶组成的信号途径在哺乳动物卵母细胞的生长及卵巢卵泡的激活和发育中起重要作用。

总之, 卵巢组织分泌 SCF, 并通过一定的信号转导途径调节卵泡的发育, 尤其是卵泡早期发育的诱导。同时, SCF 可以调控卵泡细胞间的相互作用及促性腺类固醇激素的分泌, 从而间接调控卵泡的整个发育过程。但 SCF 在卵泡发育中的具体作用机制、对后期卵泡发育的作用方式以及在卵泡细胞间的相互调控方面均还存在许多不明之处, 仍需进一步研究。

卵泡发育过程的正常与否和卵泡发育的正常启动对哺乳动物的生殖健康以及身体健康都具有重要作用。因此, 深入研究卵泡的生长发育机制对卵母细胞的体外研究以及生殖生理疾病的控制与治疗均具有重要的实践意义和应用前景。

参考文献 (References)

- [1] Kawase E *et al. Mol Reprod Dev*, 2004, **68**: 5
- [2] Tanikawa M *et al. Fertil Steril*, 2000, **73**: 1259
- [3] Zlotinik A *et al. Immunity*, 2000, **12**: 121
- [4] Reynaud K *et al. Reproduction*, 2001, **121**: 229
- [5] Webb R *et al. J Reprod Fertil Suppl*, 1999, **54**: 33

- [6] Elvin JA *et al.* *Mol Cell Endocrinol*, 2000, **159**: 1
[7] Reynaud K *et al.* *Mol Reprod Dev*, 2000, **56**: 483
[8] Klinger FG *et al.* *Dev Biol*, 2002, **244**: 85
[9] Clark DE *et al.* *J Reprod Fertil*, 1996, **106**: 329
[10] Nilsson EE *et al.* *Mol Cell Endocrinol*, 2004, **214**: 19
[11] 辛晓燕等. *实用妇产科杂志*, 2003, **19**: 213
[12] Jin X *et al.* *Mol Cell Endocrinol*, 2005, **229**: 3
[13] Gougeon A. In: Trounson AO *et al.* (eds.) *Biology and Pathology of the Oocyte*, Cambridge: Cambridge University Press, 2003, 29
[14] Wang J *et al.* *Biol Reprod*, 2004, **70**: 577
[15] Parrott JA *et al.* *Mol Reprod Dev*, 2000, **55**: 55
[16] Reynaud K *et al.* *Mol Reprod Dev*, 2000, **56**: 483
[17] Parrott JA *et al.* *Endocrinology*, 1999, **140**: 4262
[18] Thomas FH *et al.* *Endocrinology*, 2005, **146**: 941
[19] Reddy P *et al.* *Developmental Biology*, 2005, **281**: 160
[20] Jin X *et al.* *Mol Reprod Dev*, 2005, **70**: 82
[21] Liu K. *Front Biosci*, 2006, **11**: 126

Effects of Stem Cell Factor for Follicular Development

Jun-Jun Hong, Zi-Yu Wang, Feng Wang*, Dan Xu, Jie Wu, Zhong-Yuan Li

(Center of Animal Embryo Engineering and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract Stem cell factor (SCF) is the ligand of tyrosine kinase receptor (c-Kit). SCF is produced by ovary organs. SCF is essential for follicular development, especially the early development of follicles. It also activate the expression of steroid hormone in ovaries and the signaling pathways between follicular cells. And, SCF maybe regulate the follicular development through inactivating the PKC, MEK pathways and PI3 pathway.

Key words stem cell factor; follicle development; signaling pathway

Received: December 23, 2005 Accepted: June 19, 2006

This work was supported by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province

*Corresponding author. Tel: 86-25-84395381, Fax: 86-25-84395314, E-mail: f_wang2001@sina.com