

香烟烟雾诱导下的自噬对卵泡发育的影响

吴春丽^{1,2} 王雪梅¹ 喻意¹ 高英¹ 马倩芸¹ 徐莹^{1*}

(¹嘉兴学院医学院, 嘉兴 314001; ²宁波大学医学院, 宁波 315211)

摘要 吸烟是一种不良的生活习惯, 全球大约有2.5亿的女性吸烟, 但大多数吸烟女性并没有意识到吸烟对卵巢功能和生育力的影响。长期接触香烟烟雾可以减少原始卵泡和生长发育阶段卵泡的数量, 使卵巢卵泡储存量下降和卵巢功能减弱, 致使女性生育力下降, 并提早进入更年期。香烟烟雾可以诱导自噬的发生, 并且自噬是香烟烟雾诱导卵巢卵泡丢失的关键原因, 调节自噬过程可能成为控制香烟烟雾所致卵巢早衰的潜在治疗方法。

关键词 自噬; 香烟烟雾; 卵泡发育; 卵巢早衰

Impact of Autophagy Process Induced by Cigarette Smoke on Follicle Development

Wu Chunli^{1,2}, Wang Xuemei¹, Yu Yi¹, Gao Ying¹, Ma Qianyun¹, Xu Ying^{1*}

(¹Medical College of Jiaxing University, Jiaxing 314001, China; ²Medical College of Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract Cigarette smoking (CS) is harmful life style. Approximately 250 million women worldwide are daily smokers. Regrettably, most women remain unaware of the adverse effects of cigarette smoking on fertility and ovarian function. Cigarette smoke exposure can decrease the number of primordial and growth follicle, deplete ovarian follicle reserve, impair ovarian function, descend female fertility and advance menopause. Cigarette smoke exposure can induce autophagy. Instead with autophagy is a key reason of follicle loss induced by cigarette smoke. Autophagy is considered as a potential therapeutic target for CS-related premature ovarian failure.

Keywords autophagy; cigarette smoking; follicle development; premature ovarian failure

1 香烟烟雾对女性生育力的影响

众所周知, 吸烟是一种不良的生活习惯。香烟烟雾包含约4 000种化学物质, 其中大多数是氧化剂或自由基, 可以诱导氧化应激的发生, 如许多芳香烃受体(aryl hydrocarbon receptor, AhR)激动剂, 可以激活细胞色素P450(cytochrome P450), 并参与产生活性氧的过程, 这些化学物质易引起突变和致癌等不良后果, 也可以导致凋亡和自噬的发生^[1-2]。有研究表明, 香烟烟雾可能是潜在的最容易让女性接触到的有毒有害物质^[3]。尽管目前有些地区男性吸烟人

数在减少, 但成年女性和青少年女性吸烟人数在逐渐上升, 这逐渐演变成一个全球的健康问题。全世界范围内大约有2.5亿的女性吸烟, 在美国有30%的生育年龄女性是吸烟者^[4], 在加拿大大约有17%的女性吸烟且平均14支/d, 中国是世界上吸烟人数最多的国家。据2013《中国吸烟危害健康报告》数据显示, 我国女性的吸烟率达到2.4%, 人数高达1 300万。与非吸烟女性相比, 卵巢功能减弱、卵巢卵泡储存量下降、生育力下降、短暂的月经周期、低雌激素周期浓度、辅助生殖的成功率下降、提早进入更年

收稿日期: 2016-03-11 接受日期: 2016-05-03

国家级大学生创新创业训练计划项目(批准号: 20141035019)和嘉兴学院SRT项目(批准号: 2015SRT)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0573-83641567, E-mail: xuyingmrd@yahoo.com

Received: March 11, 2016 Accepted: May 3, 2016

This work was supported by the National Students Innovation and Entrepreneurship Training Program (Grant No.20141035019) and Jiaxing University SRT Fund (Grant No.2015SRT)

*Corresponding author. Tel: +86-573-83641567, E-mail: xuyingmrd@yahoo.com

网络出版时间: 2016-08-01 11:12:05 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160801.1112.010.html>

期, 都是吸烟女性的生殖功能的改变^[5-9]。遗憾的是, 大多数吸烟女性并没有意识到吸烟对卵巢功能和生育力的影响^[10]。

卵巢是雌性动物的生殖器官, 是一个动态的器官, 它的主要特点是卵泡的周期性发育和产生类固醇激素。在人类胎儿形成过程中或小鼠出生后不久, 其一生中的原始卵泡已经形成。原始卵泡池在不断重复的卵泡发育过程中逐渐耗尽, 在一个月经周期中, 通过原始卵泡招募、选择、最终形成一个优势卵泡和排卵^[11], 其中非优势卵泡发生闭锁。有研究表明, 女性长期处于香烟烟雾环境中, 会降低受精卵着床机率(12.0%~12.6%, 非吸烟者为25.0%)和怀孕的机率(19.4%~20.0%, 非吸烟者为48.3%)^[12]。长期接触香烟烟雾也会降低体外受精的成功率, 减少卵巢类固醇激素的生成, 耗尽卵巢的储备, 破坏卵母细胞的功能和生存能力^[5], 可以导致女性生育能力降低和卵巢功能早衰。香烟烟雾中的一些有毒成分会破坏卵巢内部的信号通路, 也可加速卵泡的闭锁过程, 从而过早地耗尽卵泡池中的卵泡。有研究表明, 香烟烟雾中的一些有毒成分会在特定阶段破坏卵泡的生长。例如, 多氯联苯会损害生长期的卵泡, 氧化乙烯基环己烯可以诱导原始卵泡和初级卵泡发生闭锁。苯并芘, 是一种多相的芳香族碳氢化合物, 是香烟烟雾成分中的一种, 也是一种常见的易致突变和致癌物质, 长期接触苯并芘可以选择性破坏卵泡池中处于静止期的卵泡, 并会加速耗尽原始卵泡池, 而原始卵泡破坏是卵泡丢失的重要原因。长期接触四氯二苯并-p-二恶英可致小鼠阴道发生畸形^[1], 多氯联苯、重金属等可作用于囊胚^[13]、人类脐带造血干细胞^[14], 可以诱导自噬的发生。有理由相信, 女性长期吸烟可以降低女性的生育力, 使卵泡池里的卵泡提早耗竭, 并提早进入更年期。最近的研究表明, 香烟烟雾可能通过自噬途径影响女性的卵巢功能及生育能力。

2 自噬研究概况

自噬(autophagy)是真核生物生长发育和分解代谢过程中普遍存在的一种生理现象。自噬体的形成是自噬发生的重要特征。发生自噬时, 首先形成双层膜片的分离膜, 分离膜不断包裹胞质成分, 从而形成双层膜的自噬体, 自噬体(autophosome)与溶酶体(lysosome)相互融合形成自噬溶酶体

(autopholysome), 然后溶酶体酶降解先前被吞噬的胞质成分和自噬体内膜, 故自噬是细胞内主要降解路径之一。自噬可以确保细胞在日常应激下得以生存, 它可以代谢和清除一部分受损的亚细胞成分, 如聚合的蛋白质和脂质等, 也是一种间接的保护机制^[15]。自噬可以被饥饿、能量耗竭、缺氧或化学试剂等所诱导发生。自噬与许多疾病密切相关, 例如恶性肿瘤、感染、神经病变等^[16]。

参与调控自噬过程的基因称为自噬相关基因(autophagy related gene, ATG)^[17], 目前在不同生物体中已经发现了30多个自噬相关基因^[18], 包括调节LC3(microtubule-associated protein 1 light chain 3)脂化系统的相关分子和自噬蛋白Atg12-Atg5结合系统^[19]、Beclin-1复合物和磷脂酰肌醇-3激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)^[20]。Beclin-1(即BECN1, 是酵母ATG6^[21]的同源物)与自噬相关蛋白如Bcl-2、Bif-1、Vps34、ATG14、UVRAG等形成多蛋白质复合体再参与调控自噬过程, 而PI3K/AKT途径负性调节Beclin-1, Beclin-1与抗凋亡蛋白Bcl-2之间相互作用, 从而调节自噬的活性。ATG14也称为ATG14L或Barkor(即与Beclin-1相关的自噬关键性调节蛋白)。在哺乳动物细胞中, ATG14定位于内质网、吞噬泡和成熟的自噬体上。当ATG14过度表达时, 自噬体可以表现为体积增大, 表明ATG在自噬体的形成过程中起重要作用。研究表明, ATG14可以直接与Beclin-1-PI3KC3复合体中的Beclin-1作用, 并促进t-SNAREs(target soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors)、突触融合蛋白17(syntaxin 17, STX17)、SNAP29(synaptosome associated protein 29 kDa)重新组装完全融合形成蛋白脂质体(proteoliposomes), 进而与定位于溶酶体上的囊泡相关膜蛋白8(vesicle-associated membrane protein 8, VAMP8)相互作用, 从而促进自噬体和溶酶体发生融合^[15]。在早期胚胎发育过程中, 哺乳动物卵巢卵母细胞中的RNA和蛋白质通过自噬途径被降解为小分子物质, 并激活受精卵细胞的RNA翻译和转录的过程^[22-24]。

在能量不足或饥饿状态下, 哺乳动物雷帕霉素靶点(mammalian target of rapamycin, mTOR)会被抑制, 促使自噬激活磷酸腺苷活化蛋白激酶(adenine monophosphate activated protein kinase, AMPK)和自噬相关蛋白1(Unc-51 like kinase 1, ULK1), 进而加

重氧化应激反应。然而, 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物1(mTOR complex 1, mTORC1)对细胞的生长发育和代谢过程具有重要的调节作用, 它通过诱导ULK1、ATG13、ATG101和FIP200(FAK-family interacting protein of 200 kDa)发生磷酸化而抑制自噬的发生。自噬抑制剂与mTORC1整合多重信号, 侧面反映生长因子、营养素或能量的作用力, 为细胞生长提供一个良好的内环境, 并且能使细胞在应激状态下顺利进入分解代谢过程^[25]。

3 香烟烟雾对自噬相关基因表达的影响

自噬是哺乳动物应激状态下不可避免的反应。有研究已经证实, 香烟烟雾可以促进肺、肠、卵巢、胰腺细胞和成纤维细胞发生自噬^[26-28]。在小鼠的肺、膈肌^[29]、卵巢^[28]、血管平滑肌^[30]细胞中, 香烟烟雾诱导的氧化应激可以促使AMPK的水平上升。AMPK可以在细胞进行能量代谢时起重要的调节作用。AMPK在细胞内ATP水平下降时被激活, 其可以促进分解途径, 而干扰合成途径, 从而影响细胞的生长和增殖^[31]。尽管AMPK被称为是一种能量的传感器和调节器, 现在有研究表明, AMPK还是一种氧化应激的感应器和氧化还原反应的调节器。香烟烟雾可以使细胞产生活性氧, 激活AMPK途径, 但AMPK也可以抑制氧化应激。因此, AMPK可以维持细胞内的氧化还原反应的平衡。活化的AMPK可以启动自噬信号途径, 随后ATG7在自噬发生过程中起重要作用(激活自噬级联), 而CDKN1B的水平下降预示着细胞周期的调节存在异常。香烟烟雾可以上调Parkin蛋白质水平, 而使线粒体融合蛋白1(mitofusin 1, MFN1)与线粒体融合蛋白2(mitofusin 2, MFN2)水平下降, 预示着自噬与线粒体功能紊乱有关, 表明发生了线粒体自噬^[32]。

Class I PI3K/AKT信号途径对细胞的生长和存活起促进作用^[33], PI3K/AKT信号途径可以激活mTOR途径, mTOR与细胞的生长因素、营养素和应激信号变化相关, 调节细胞的新陈代谢^[34], 因而mTOR途径也可以调节细胞生长^[35], 是自噬途径的负调节者^[36]。ULK1是一种丝氨酸/苏氨酸激酶, 在能量减少和缺乏时, 通过磷酸化Beclin-1, 激活脂酶VPS34, 调节自噬体的前体——吞噬泡的形成^[37]。对于下游的mTOR信号途径, 长期接触香烟烟雾可以诱导ULK1的表达发生变化, 主要是因为AMPK和

mTOR通过协调ULK1的磷酸化作用来调节自噬途径^[34]。而上游的AMPK可以促使mTOR蛋白质水平下降^[28]。

4 香烟烟雾对小鼠卵巢和卵泡自噬相关基因表达的影响

香烟烟雾是众所周知的危险因子, 对女性生殖系统来说是潜在的高风险因子, 但也是可以预防的危险因子。长期接触香烟烟雾可以减少原始卵泡和生长发育阶段卵泡的数量, 使卵泡发育迟缓, 减轻卵巢的重量, 也可使卵泡期提早进入黄体期^[38], 最后耗竭卵巢中的卵泡, 并导致女性提早进入更年期。对于女性来说, 提早进入更年期标志着卵泡池中的卵泡耗竭, 最常见的是原始卵泡耗竭, 导致停止排卵, 并且周期性的激素水平发生改变, 最后导致绝经。

香烟烟雾可以通过诱导卵巢发生慢性氧化应激^[39], 促使细胞周期调节发生异常, 进而影响相关基因的表达。研究发现, 长期接触香烟烟雾, 细胞周期素依赖性激酶抑制剂1B/p27(cyclin dependent kinase inhibitor 1B/p27, CDKN1B/p27)的表达下降, 其可以明显影响细胞周期, 是重要的细胞周期的调节分子, 故香烟烟雾可以通过影响细胞周期, 从而阻碍甚至是破坏卵巢卵泡生长发育的自然进程。

研究表明, C57BL/6雌性小鼠长期接触香烟烟雾可以促使其卵巢自噬相关基因的表达发生变化, 如表1所示^[28]。荧光定量PCR结果显示, 香烟烟雾接触组小鼠卵巢中的*Prkaa2*、*Pik3c3*、*Map1lc3b*的表达明显上升, *Akt1*和*mTOR*的表达明显下降, *Cxcr4*的表达稍下降, *Pik3r1*、*Eif4ebp1*、*Ulk*、*Map1lc3a*、*Pik3cg*、*Prkaa1*、*Rps6*、*Cdkn1b*、*Gapdh*、*Bad*、*Sqstm1/p62*和*Atg7*的表达无明显变化。Western blot结果显示, 实验组小鼠(香烟烟雾接触组)中, AMPK催化亚基 $\alpha1+\alpha2$ 和ATG7蛋白的表达明显上升, AKT1、PI3KC3、mTOR、CDKN1B/p27和CXCR4的水平下降, 而p62/SQSTM1的水平无明显的变化^[28]。其中耐人寻味的是, ATG7的蛋白质水平明显上升, 但RNA水平未见上升, 反而有所下降, 这其中的机制尚不清楚。推测是否血管内皮细胞或其他细胞合成的ATG7可通过血液运输到卵巢, 参与香烟烟雾诱导的卵巢自噬调控。

有多项研究表明, 长期接触香烟烟雾可以诱导卵巢发生氧化应激和内质网应激, 从而触发自噬途

表1 长期接触香烟烟雾可以诱导卵巢自噬相关基因表达变化(根据参考文献[28]修改)

Table 1 Ovarian autophagy genes significantly altered by cigarette smoke exposure (modified from reference [28])

基因 Gene	上调/下调(↑/↓) Up-graduate/down graduate (↑/↓)	在自噬中的作用 Role in autophagy
<i>Arsa</i>	↑	Lysosomal arylsulfatase
<i>Atg4b</i>	↓	Cysteine protease ATG4B, cleaves LC3 precursor to LC3-I
<i>Atg7</i>	↑	Enzyme essential for binding of other Atg proteins
<i>Bad</i>	↑	Competes with Beclin 1 for binding site on Bcl-2 proteins
<i>Bak1</i>	↑	Bcl-2 interacting protein
<i>Cdkn1b</i>	↑	Coregulator of autophagy and the cell cycle
<i>Ctsb</i>	↓	Lysosomal cysteine protease, vesicle trafficking
<i>Ctss</i>	↓	Lysosomal cysteine protease
<i>Cxcr4</i>	↑	Ligand binding to CXCR4 can initiate autophagy
<i>Hsp90ab1</i>	↓	A negative regulator of autophagy
<i>Map1lc3a</i>	↑	Autophagic vacuole formation, organelle sequestration within autophagosome
<i>Pik3c3</i>	↑	Binds to Beclin-1, essential in autophagosome formation
<i>Pik3r4</i>	↓	Regulator of autophagy in response to alternate intracellular signals
<i>Rab24</i>	↑	GTPase participated in vesicular transport
<i>Sqstm1</i>	↑	Binds to LC3 to deliver ubiquitinated protein aggregates to autophagosome; eliminate damaged mitochondria
<i>Tgm2</i>	↓	Enzyme participated in autophagolysosome maturation
<i>Gapdh</i>	↑	Increases mitochondrial autophagy

Arsa: 芳基硫酸酯酶A基因; *Atg4b*: 自噬相关基因4B; *Atg7*: 自噬相关基因7; *Bad*: 凋亡相关基因Bad; *Bak1*: 凋亡相关基因Bak1; *Cdkn1b*: 细胞周期依赖蛋白激酶抑制剂1b基因; *Ctsb*: 组织蛋白酶B基因; *Ctss*: 组织蛋白酶S基因; *Cxcr4*: 趋化因子受体4基因; *Hsp90ab1*: 热休克蛋白90ab1基因; *Map1lc3a*: 微管相关蛋白1轻链3a基因; *Pik3c3*: 磷脂酰肌醇-3-激酶催化亚单位3基因; *Pik3r4*: 磷脂酰肌醇-3-激酶调节亚单位4基因; *Rab24*: 编码Ras蛋白家族的一类小GTP酶; *Sqstm1*: 又称p62(泛素结合蛋白p62); *Tgm2*: 谷氨酰胺转移酶2基因; *Gapdh*: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因。

Arsa: arylsulfatase; *Atg4b*: autophagy related gene 4 homolog B; *Atg7*: autophagy related gene 7; *Bad*: BCL2-associated agonist of cell death; *Bak1*: BCL2-antagonist/killer 1; *Cdkn1b*: cyclin-dependent kinase inhibitor 1B; *Ctsb*: cathepsin B; *Ctss*: cathepsin S; *Cxcr4*: chemokine (C-X-C motif) receptor 4; *Hsp90ab1*: heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1; *Map1lc3a*: microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha; *Pik3c3*: phosphoinositide-3-kinase class 3; *Pik3r4*: phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 4; *Rab24*: member RAS oncogene family; *Sqstm1*: sequestosome 1, ubiquitin-binding protein p62; *Tgm2*: transglutaminase 2; *Gapdh*: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

径的启动,这在卵巢卵泡丢失的过程中起重要作用,可能是一种引起卵泡发育异常和引起生育力低下的新原因。有研究显示,把8周龄的C57BL/6雌性小鼠全身暴露在香烟烟雾中,制造香烟烟雾环境系统,每周作用5 d, 2次/d,分别接触香烟烟雾4周、8周、9周、17周,发现卵泡在各个生长发育时期的卵泡数量均在减少。而小鼠接触香烟烟雾8周时,其原始卵泡和总的卵泡数量丢失最明显。小鼠接触香烟烟雾8周后,处死小鼠并取出卵巢,制成卵巢匀浆,并检测其应激反应,发现与对照组相比,实验组小鼠的卵巢匀浆中热休克蛋白Hsp25水平上升。Western blot结果显示,实验组小鼠卵巢中的超氧化物歧化酶1(superoxide dismutase, SOD1)表达并没有明显变化,但SOD2的表达明显比对照组低,而SOD2可以作为减轻或消除活性氧对机体氧化或过氧化的损害,预示着,长期接触香烟烟雾会导致体内氧自由基清除

能力的降低。此外,实验组小鼠和对照组小鼠相比,Bcl-2表达下降,但活化的胱冬肽酶-3(Caspase-3)^[6]和Bax的表达并没有明显变化,尽管Bax:Bcl-2的比例可引起凋亡,但没有其他证据证明其会促进凋亡的发生。故长期接触香烟烟雾并不一定引起卵巢中的卵泡发生凋亡反应。荧光定量PCR结果显示,实验组小鼠的Beclin-1与LC3的表达分别是对照组的1.46倍和1.49倍^[28]。

使用透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)观察发现,颗粒细胞的细胞核形态并没有发生较大的变化,但实验组(香烟烟雾处理组)中颗粒细胞上的溶酶体和自噬体数目较多^[1,32],实验组颗粒细胞的细胞核因较多的自噬体存在而移位。此外发现,香烟烟雾处理组的卵巢上有部分自噬体占据在肿胀的线粒体上。Beclin-1在包括原始卵泡在内的卵巢发育的各个阶段均有表达。通过

免疫组化发现, 对照组中Beclin-1仅在卵母细胞上有表达, 但在实验组卵巢的原始卵泡中发现, 在颗粒细胞上也有表达。在对照组卵巢中, Beclin-1的着色是小点状的, 在细胞质中只有少量的着色。然而在实验组卵巢中, 细胞质的着色较明显, 且呈弥散样。Western blot结果显示, 实验组小鼠卵巢匀浆的Bcl-2水平明显下降, 而Beclin-1和LC3蛋白水平明显上升。ELISA结果也表明, 实验组Beclin-1水平较高。

线粒体稳态对细胞的生存至关重要。卵母细胞需要大量的能量发育成熟, 需要大量的线粒体供能, 并且需要修复和维持线粒体DNA(mtDNA)的稳定性。因此, 线粒体分裂和融合之间的平衡需要维持, 其关键蛋白对于卵母细胞和颗粒细胞的生长发育至关重要^[32,40-42]。与对照组相比, 实验组小鼠卵巢的*parkin*基因和Parkin蛋白质(Parkin在介导线粒体自噬方面具有重要作用^[43])的表达升高, 然而*Mfn1*和*Mfn2*基因的表达下降, 线粒体融合蛋白MFN1和MFN2水平明显下降, 促使线粒体碎片增多^[44], 从而导致线粒体功能发生障碍, 最终发生线粒体自噬。故长期接触香烟烟雾可以促使卵巢颗粒细胞上的自噬体数目增多, 激活自噬途径, 诱导颗粒细胞中的线粒体发生功能障碍, 减少卵巢颗粒细胞的数量, 从而导致卵泡的丢失, 最终加速卵泡池里的原始卵泡发生耗竭^[1,32]。

CXCR4与CXCL12是受体与配体的关系, 通过提高细胞内的钙离子浓度来传递信号, 并促进MAPK1/MAPK3的活性, 其也可以作为细胞外泛素蛋白的受体, 从而提高细胞内钙离子水平, 降低细胞的cAMP水平, 因此其可以同时参与细胞存活和细胞死亡过程^[45]。实验组动物在接触香烟烟雾8周后, 卵巢中CXCR4蛋白质水平下降, *Bad*基因的表达并没有特别大的变化, 而与CXCR4配体结合可以启动自噬过程的发生^[28], 香烟烟雾还可通过激活AMPK途径联合抑制抗自噬因子AKT和mTOR, 促进卵巢自噬过程的发生, 从而使卵巢中的卵泡发生丢失^[28], 推测自噬过程在香烟烟雾作用后的卵巢中发挥着重要的作用。故有理由认为, 长期接触香烟烟雾可以促使卵泡的丢失, 但可能并不是通过激活凋亡途径, 而是通过氧化应激激活了自噬信号通路, 自噬作用可能是香烟烟雾诱导卵巢卵泡丢失的关键原因。

通过以上研究推测凋亡过程在卵泡丢失过程中所起的作用较弱, 起关键作用的是自噬途径^[28]。

卵巢颗粒细胞可能是发生自噬的主要靶细胞之一, 对于哺乳动物如人类和鼠类的颗粒细胞来说, 自噬是一种重要的程序性细胞死亡途径^[15]。长期接触香烟烟雾可以诱导卵巢颗粒细胞发生自噬从而死亡^[1,15]。本实验室的研究发现, 体外培养的颗粒细胞在香烟烟雾水溶液作用后, 自噬相关基因的表达发生了改变(未发表的研究结果)。

5 展望

在女性的卵巢中, 不到1%的卵泡能完成排卵, 大部分卵泡发生闭锁而消失。若相关不利因素加速诱导卵巢中的卵泡发生闭锁, 则易导致卵巢功能早衰, 这是女性不孕的重要因素, 而长期接触香烟烟雾就是其中一项重要的不利因素。长期接触香烟烟雾可以使卵巢功能减弱、卵巢卵泡储存量下降, 致使女性生育力下降、辅助生殖的成功率下降并提早进入更年期。

自噬是一种重要的程序性细胞死亡途径, 它可能在卵巢卵泡发育过程中决定卵泡的命运(闭锁或是排卵)。长期接触香烟烟雾可以通过上调AMPK信号途径和抑制抗自噬因子AKT和mTOR等来诱导卵巢卵泡发生自噬而闭锁, 自噬可能是香烟烟雾诱导卵巢卵泡丢失的关键原因, 那么调节自噬过程可能成为香烟烟雾所致卵巢早衰的潜在治疗方法。但是, 目前香烟烟雾影响自噬在卵巢卵泡发育过程中的研究报道非常少, 值得深入研究, 以期为女性不孕不育的原因探索提供理论依据。

参考文献 (References)

- 1 Gannon AM, Stämpfli 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.
- 2 Tagawa Y, Hiramatsu N, Kasai A, Hayakawa K, Okamura M, Yao J, *et al.* Induction of apoptosis by cigarette smoke via ROS-dependent endoplasmic reticulum stress and CCAAT/enhancerbinding protein-homologous protein (CHOP). *Free Radic Biol Med* 2008; 45(1): 50-9.
- 3 Sadeu JC, Hughes CL, Agarwal S, Foster WG. Alcohol, drugs, caffeine, tobacco and environmental contaminant exposure: Reproductive health consequences and clinical implications. *Crit Rev Toxicol* 2010; 40(7): 633-52.
- 4 Woodruff TJ, Zota AR, Schwartz JM. Environmental chemicals in pregnant women in the United States: NHANES 2003-2004. *Environ Health Perspect* 2011; 119(6): 878-85.
- 5 Fuentes A, Munoz A, Barnhart K, Arguello B, Diaz M, Pommer R. Recent cigarette smoking and assisted reproductive technologies

- outcome. *Fertil Steril* 2010; 93(1): 89-95.
- 6 Tuttle AM, Stämpfli M, Foster WG. Cigarette smoke causes follicle loss in mice ovaries at concentrations representative of human exposure. *Hum Reprod* 2009; 24(6): 1452-9.
 - 7 Waylen AL, Metwally M, Jones GL, Wilkinson AJ, Ledger WL. Effects of cigarette smoking upon clinical outcomes of assisted reproduction: A meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2009; 15(1): 31-44.
 - 8 Freour T, Masson D, Mirallie S, Jean M, Bach K, Dejoie T, *et al.* Active smoking compromises IVF outcome and affects ovarian reserve. *Reprod Biomed Online* 2008; 16(1): 96-102.
 - 9 Baird WM, Hooven LA, Mahadevan B. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environ Mol Mutagen* 2005; 45(2/3): 106-14.
 - 10 Cohen B, Evers S, Manske S, Bercovitz K, Edward HG. Smoking, physical activity and breakfast consumption among secondary school students in a southwestern ontario community. *Can J Public Health* 2003; 94(1): 41-4.
 - 11 Knight PG, Glister C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction* 2006; 132(2): 191-206.
 - 12 Neal MS, Hughes EG, Holloway AC, Foster WG. Sidestream smoking is equally as damaging as mainstream smoking on IVF outcomes. *Hum Reprod* 2005; 20(9): 2531-5.
 - 13 Ptak G, Zacchini F, Czernik M, Fidanza A, Palmieri C, Della Salda L, *et al.* A short exposure to polychlorinated biphenyls deregulates cellular autophagy in mammalian blastocyst *in vitro*. *Hum Reprod* 2012; 27(4): 1034-42.
 - 14 Di Gioacchino M, Petrarca C, Perrone A, Farina M, Sabbioni E, Hartung T, *et al.* Autophagy as an ultrastructural marker of heavy metal toxicity in human cord blood hematopoietic stem cells. *Sci Total Environ* 2008; 392(1): 50-8.
 - 15 Diao J, Liu R, Rong Y, Zhao M, Zhang J, Lai Y, *et al.* ATG14 promotes membrane tethering and fusion of autophagosomes to endolysosomes. *Nature* 2015; 520(7548): 563-6.
 - 16 Inguscio V, Panzarini E, Dini L. Autophagy contributes to the death/survival balance in cancer photodynamic therapy. *Cells* 2012; 1(3): 464-91.
 - 17 Brech A, Ahlquist T, Lothe RA, Stenmark H. Autophagy in tumour suppression and promotion. *Mol Oncol* 2009; 3(4): 366-75.
 - 18 李乐兴, 戴汉川. 细胞自噬调控的分子机制研究进展. 中国细胞生物学学报(Li Lexing, Dai Hanchuan. Research progress of the molecular mechanism of autophagy regulation. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2015; 37(2): 263-70.
 - 19 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.
 - 20 吴春丽, 郭燕君, 徐海琦, 蒋晓丽, 徐 营. 自噬与哺乳动物卵泡闭锁. 中国细胞生物学学报(Wu Chunli, Guo Yanjun, Xu Haiqi, Jiang Xiaoli, Xu Ying. Autophagy and mammalian follicular atresia. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2013; 35(9): 1397-404.
 - 21 方梦蝶, 刘 波, 刘 伟. 自噬的分子细胞机制研究进展. 中国细胞生物学学报(Fang Mengdie, Liu Bo, Liu Wei. Molecular cell mechanism of autophagy. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2012; 34(4): 382-90.
 - 22 康 静, 董自梅, 陈广文. 涡虫自噬的研究进展. 中国细胞生物学学报(Kang Jing, Dong Zimei, Chen Guangwen. Advance of the autophagy in planarian. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2016; 38(2): 210-5.
 - 23 Fimia GM, Stoykova A, Romagnoli A, Giunta L, Di Bartolomeo S, Nardacci R, *et al.* Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature* 2007; 447(7148): 1121-5.
 - 24 Cecconi F, Di BS, Nardacci R, Fuoco C, Corazzari M, Giunta L, *et al.* A novel role for autophagy in neurodevelopment. *Autophagy* 2007; 3(5): 506-8.
 - 25 Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* 2011; 13(2): 132-41.
 - 26 Ito S, Araya J, Kurita Y, Kobayashi K, Takasaka N, Yoshida M, *et al.* PARK2-mediated mitophagy is involved in regulation of HBEC senescence in COPD pathogenesis. *Autophagy* 2015; 11(3): 547-59.
 - 27 Tran I, Ji C, Ni I, Min T, Tang D, Vij N. Role of cigarette smoke-induced aggresome-formation in COPD-emphysema pathogenesis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2015; 53(2): 159-73.
 - 28 Furlong HC, Stämpfli MR, Gannon AM, Foster WG. Cigarette smoke exposure triggers the autophagic cascade via activation of the AMPK pathway in mice. *Biol Reprod* 2015; 93(4): 93.
 - 29 Carlos SP, de Dias AS, Alberto L, Junior F, Patricio PD, Graciano T, *et al.* Oxidative damage induced by cigarette smoke exposure in mice: Impact on lung tissue and diaphragm muscle. *J Bras Pneumol* 2014; 40(4): 411-20.
 - 30 Wang S, Zhang C, Zhang M, Liang B, Zhu H, Lee J, *et al.* Activation of AMP-activated protein kinase $\alpha 2$ by nicotine instigates formation of abdominal aortic aneurysms in mice *in vivo*. *Nat Med* 2012; 18(6): 902-10.
 - 31 Hardie DG. AMP-activated protein kinase-an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev* 2011; 25(18): 1895-908.
 - 32 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.
 - 33 Riley JK, Carayannopoulos MO, Wyman AH, Chi M, Ratajczak CK, Moley KH. The PI3K/Akt pathway is present and functional in the preimplantation mouse embryo. *Dev Biol* 2005; 284(2): 377-86.
 - 34 Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* 2011; 13(2): 132-41.
 - 35 Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(7): 489-501.
 - 36 Alers S, Löffler AS, Wesselborg S, Stork B. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: Cross talk, shortcuts and feedbacks. *Mol Cell Biol* 2012; 32(1): 2-11.
 - 37 Tripathi DN, Chowdhury R, Trudel LJ, Tee AR, Slack RS, Walker CL, *et al.* Reactive nitrogen species regulate autophagy through ATMAMPK-TSC2-mediated suppression of mTORC1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(32): E2950-7.
 - 38 Sadeu JC, Foster WG. Cigarette smoke condensate exposure delays follicular development and function in a stage-dependent

- manner. *Fertil Steril* 2011; 95(7): 2410-7.
- 39 Swauger JE, Steichen TJ, Murphy PA, Kinsler S. An analysis of the mainstream smoke chemistry of samples of the U.S. cigarette market acquired between 1995 and 2000. *Regul Toxicol Pharmacol* 2002; 35(2 Pt 1): 142-56.
- 40 Dyce PW, Norris RP, Lampe PD, Kidder GM. Phosphorylation of serine residues in the C-terminal cytoplasmic tail of connexin43 regulates proliferation of ovarian granulosa cells. *J Membr Biol* 2012; 245(5/6): 291-301.
- 41 Zhang B, Wei Q, Shi S, Dong F, Shi F, Xu Y. Immunolocalization and expression pattern of Gpr3 in the ovary and its effect on proliferation of ovarian granulosa cells in pigs. *J Reprod Dev* 2012; 58(4): 410-9.
- 42 Bennett J, Wu YG, Gossen J, Zhou P, Stocco C. Loss of GATA-6 and GATA-4 in granulosa cells blocks folliculogenesis, ovulation and follicle stimulating hormone receptor expression leading to female infertility. *Endocrinology* 2012; 153(5): 2474-85.
- 43 Wolfdieter S, Philipp JK. Regulation of PINK1-Parkin-mediated mitophagy. *Autophagy* 2011; 7(3): 266-78.
- 44 Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* 2003; 160(2): 189-200.
- 45 Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, *et al.* Molecular definitions of cell death subroutines: Recommendations of the nomenclature committee on cell death 2012. *Cell Death Differ* 2012; 19(1): 107-20.