

# Bcl-2 蛋白家族对卵泡和早期胚胎生长发育的调节

倪永林(综述)/林少达\*(审校)

(汕头大学医学院第一附属医院内分泌科,广东 汕头 515041)

【摘要】Bcl-2 蛋白家族成员在哺乳动物卵泡和早期胚胎生长发育过程中发挥着重要的作用,该家族各成员之间,以及与其他调控蛋白之间相互作用、相互影响形成一个精密的调节网络。了解 Bcl-2 蛋白家族成员对卵泡和早期胚胎的调节作用可为女性生殖疾病提供基础研究方向,也可为临床诊断治疗确定分子靶点的研究提供参考依据。为此,本文对 Bcl-2 蛋白家族 3 个亚家族中 10 种主要蛋白在调节卵泡和早期胚胎生长发育中的作用作一综述。

【关键词】Bcl-2 蛋白家族; 卵泡; 卵细胞; 颗粒细胞; 早期胚胎

中图分类号: R321.1

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2008)02-0166-03

目前研究已证实,哺乳动物中 Bcl-2 蛋白家族至少有 15 个成员,分为 3 个亚家族,每个亚家族的功能有所不同<sup>[1]</sup>: ①Bcl-2 亚家族: 抑制细胞凋亡的发生,结构上拥有保守的 BH1~BH4 的结构域和跨膜区, BH1 与 BH2 结构域是抗凋亡蛋白必备的结构域,同时也在同源或异源性二聚体和离子通道的形成中发挥重要的作用,主要包括 Bcl-2、Bcl-XL、Bcl-W 和 Mcl-1 等; ②Bax 亚家族: 促进细胞凋亡,结构上缺乏 BH4 结构域,只含 BH1~BH3 和跨膜区,包括 Bax、Bak、Bok; ③BH3 亚家族: 促进细胞凋亡,结构上仅具有 1 个保守的 BH3 同源结构域,主要包括 Bad、Bim、Bid 和 Bik 等。现将 Bcl-2 蛋白家族 3 个亚家族中 10 种主要蛋白在调节卵泡和早期胚胎生长发育中的作用作一综述。

## 1 Bcl-2 蛋白家族对卵泡发育的调节作用

卵泡由居于中心的卵细胞和周围的颗粒细胞、卵泡膜细胞组成,发育阶段可分为: 始基卵泡; 初级卵泡和次级卵泡(这两个阶段可统称为窦前卵泡); 窦状卵泡; 排卵前卵泡。目前的研究指出,生长期卵泡和排卵前卵泡发生闭锁的机制是颗粒细胞首先启动凋亡,继而波及卵母细胞<sup>[2]</sup>。始基卵泡和初级卵泡的卵母细胞中发现了凋亡 DNA 断裂片段,意味着静止卵泡的凋亡是由卵母细胞启动的<sup>[2]</sup>。Bcl-2 蛋白家族各成员对各阶段卵泡的生长发育行使着调节作用。

### 1.1 Bcl-2 亚家族对卵泡发育的保护作用

#### 1.1.1 Bcl-2 蛋白

Bcl-2 基因是 Tsujimoto 等<sup>[3]</sup>从滤泡型非霍奇金 B 细胞淋巴瘤患者第 14 和 18 号染色体易位断裂点 t(14, 18)(q31~q21) 中分离获得的细胞凋亡调控基因,定位于染色体 18q213,编码 229 个氨基酸。Bcl-2 是该家族中第一个被发现的凋亡蛋白, Morita 等<sup>[4]</sup>

利用转基因技术培育出只在卵细胞表达 Bcl-2 而在体细胞中无表达的小鼠,发现卵细胞凋亡受抑制,这些小鼠窦前卵泡的闭锁明显少于野生型小鼠,说明 Bcl-2 有保护窦前卵泡的作用,其作用机制可能是抑制卵细胞凋亡。Vaskivuo 等<sup>[5]</sup>在 Bcl-2 基因过度表达的小鼠出生 7 d 后(即始基卵泡储备池完全形成时期),观察到始基卵泡数量增多, Depalo 等<sup>[3]</sup>研究证实 Bcl-2 蛋白有保护始基卵泡数量的作用。周东蕊等<sup>[6]</sup>用外源 Bcl-2 基因转染鸡的卵泡颗粒细胞,使第 2 代卵泡颗粒细胞凋亡比例下降,说明 Bcl-2 基因可以促进鸡卵泡颗粒细胞的分裂,抑制其凋亡,提示 Bcl-2 蛋白可以通过卵泡内颗粒细胞发挥其抗凋亡作用。上述研究表明 Bcl-2 不仅可以抑制卵细胞凋亡或是促进始基卵泡数量增多等途径发挥其对卵泡的发育调节作用,其抗凋亡作用还可能通过卵泡内颗粒细胞发挥作用。而 Tomic 等<sup>[7]</sup>对小鼠生长期卵泡的研究发现 Bcl-2 蛋白只存在于次级卵泡和窦状卵泡的颗粒细胞中,在卵泡整个生长与退化过程中无明显量的变化,提示 Bcl-2 蛋白对生长期卵泡闭锁不起主导作用<sup>[6]</sup>。Vaskivuo 等<sup>[5]</sup>的研究发现在人类卵泡生长过程中也存在上述类似的情况。

#### 1.1.2 Bcl-XL 蛋白

Bcl-XL 蛋白是一个可与促凋亡蛋白 Bax 结合为异源二聚体的 Bcl-2 亚家族成员,主要分布在卵泡的颗粒细胞中。Hu 等<sup>[8]</sup>使用细胞毒性药物诱导大鼠卵泡闭锁时观察到 Bcl-XL 的作用目标为小窦前卵泡(直径约 25~100 μm),它从线粒体转移到胞浆导致线粒体中 Bax/Bcl-XL 比例升高,从而启动小窦前卵泡凋亡,提示 Bcl-XL 对始基卵泡和窦前卵泡有保护作用。Jin 等<sup>[9]</sup>用干细胞因子培养卵巢组织时,在始基卵泡中检测到 Bcl-XL 和 Bcl-2 表达水平上调, Bax 蛋白的表达水平下调,始基卵泡凋亡减少,证实了上述结论。Johnson 等<sup>[10]</sup>研究鸡卵泡发育时发现直径为 4~8

收稿日期: 2007-11-17; 修订日期: 2008-01-03

作者简介: 倪永林(1978-),男,湖北黄冈人,汕头大学医学院硕士研究生,研究方向: 内分泌疾病。

\* Correspondence to: LIN Shao-da, E-mail: linshaoda@126.com

mm 的卵泡颗粒细胞最易发生凋亡而导致卵泡闭锁, 此期颗粒细胞中几乎检测不到 Bcl-XL 的表达产物, 而预排卵卵泡中颗粒细胞的 Bcl-XL 产物最多, 说明鸡卵泡发育的不同时期颗粒细胞发生凋亡的敏感程度与 Bcl-XL 表达多少有关。Johnson 等<sup>[10]</sup>研究还发现排卵前卵泡颗粒细胞的抗凋亡作用与 Bcl-XL 蛋白表达及其磷酸化形式有关, 颗粒细胞中 Bcl-XL 含量的升高和磷酸化是促性腺激素通过环腺苷酸/环磷酸腺苷信号途径介导的。

### 1.1.3 Mcl-1 蛋白

Mcl-1 在人类原始生殖细胞形成始基卵泡 (胚胎第 18 ~ 20 周) 过程中表达量增加, 该表达只存在于卵细胞中, 体细胞 (颗粒细胞和膜细胞) 中未发现, 上游促进卵泡凋亡的因子可使 Mcl-1 表达增加, 提示 Mcl-1 可能在始基卵泡形成和生长过程中起保护作用<sup>[11]</sup>。Mcl-1 可与 Bax 亚家族的 Bax、Bak、Bok 结合为异源二聚体, 但是其与自身结合为同源二聚体的能力差。Jonson 等<sup>[10]</sup>发现成人卵巢的窦状卵泡和窦前卵泡卵母细胞中存在较多的 Mcl-1 蛋白, 颗粒细胞中仅存在少量, 由于窦状卵泡和窦前卵泡时期卵泡闭锁是由卵母细胞凋亡启动的, 推测该蛋白在这两个时期通过卵母细胞来调节卵泡闭锁。

## 1.2 Bax 亚家族对卵泡发育的促凋亡作用

### 1.2.1 Bax 蛋白

Perez 等<sup>[12]</sup>研究发现 Bax<sup>-/-</sup>雌性小鼠比它们的野生型同类小鼠的原始卵泡数多出 3 倍, 而且这种过量的卵泡一直保存到较高的月龄, 表明 Bax 蛋白为卵泡闭锁的促进因子, 选择性干扰 Bax 的功能, 卵巢的生命周期能够延长。Kugu 等<sup>[13]</sup>用免疫组化方法测定人卵巢颗粒细胞中的 Bax 蛋白, 结果发现其在早期闭锁卵泡中的颗粒细胞中大量表达, 明显闭锁卵泡中却未见表达, 说明 Bax 蛋白在卵泡闭锁早期有促进颗粒细胞凋亡的作用。Vaskivuo 等<sup>[6]</sup>及 Tomic 等<sup>[7]</sup>研究证实, 在人类及小鼠初级、次级以及窦状卵泡的颗粒细胞和膜细胞中都有 Bax 蛋白的存在, 并且该蛋白表达的量是随卵泡的生长而增加, Bax 促凋亡蛋白的作用机制可能是与抗凋亡蛋白 Bcl-2、Bcl-XL、Mcl-1 结合成异源二聚体而使 Bax 失去促凋亡作用, 当 Bax 过多而不能被完全结合时则会引起细胞凋亡。

### 1.2.2 Bak 蛋白

Bak 蛋白主要在卵泡的颗粒细胞中存在, 但在卵泡的正常生理不同阶段中未见明显量的变化, 提示其在卵泡生长凋亡过程中未发挥明显作用<sup>[14]</sup>。Lim 等<sup>[15]</sup>研究发现 Bak 基因敲除的中国仓鼠卵巢颗粒细胞经过紫外线照射后生存期延长, 表明 Bak 蛋白在卵泡损伤后凋亡过程中发挥促进作用。

### 1.2.3 Bok 蛋白

研究发现 Bok 蛋白只选择性地与 Mcl-1 结合为异源二聚体来调节卵泡凋亡, 与其他抑制凋亡蛋白不发生相互作用<sup>[2]</sup>。Bok 蛋白在人类原始生殖细胞形成始基卵泡中表达, 始基卵泡闭锁时表达增加, 提示其发挥促进卵泡凋亡的作用。

## 1.3 BH3 亚家族对卵泡发育的调节作用

### 1.3.1 Bad 蛋白

BH3 亚家族的 Bad 蛋白无跨膜部分, 它作为配体优先与 Bcl-2 或 Bcl-XL 形成异源二聚体。Hartley 等<sup>[11]</sup>应用免疫染色发现 Bad 蛋白主要存在于胎儿卵巢体细胞中, 微量存在于生殖细胞中<sup>[10]</sup>, 提示 Bad 蛋白对胚胎时期生殖细胞的生长、发育作用较

小。Hu 等<sup>[8]</sup>研究发现 Bad 蛋白表达水平的上调与卵泡凋亡率呈正相关。Bad 蛋白在窦前卵泡和窦状卵泡的颗粒细胞中都有表达, 颗粒细胞在这两个时期卵泡的闭锁中起主要作用, 提示 Bad 蛋白调节窦前卵泡和窦状卵泡的凋亡, 推测其机制可能是 Bad 蛋白受上游启动凋亡因子的调节, 与 Bcl-2 或 Bcl-XL 形成异源二聚体, 阻滞这两种抑制凋亡蛋白对卵泡的保护作用。Leo 等<sup>[16]</sup>通过研究 Bad 蛋白与 Mcl-1 蛋白的关系发现 Mcl-1 蛋白是 Bad 蛋白在卵巢中的受体, Bad 蛋白通过与 Mcl-1 蛋白结合起着保护卵泡的作用。

### 1.3.2 Bim 蛋白

Bim 蛋白有多种异构体, 可与 Bcl-2 蛋白结合, 隋旭霞等<sup>[17]</sup>利用免疫组化方法发现 Bim 蛋白在新生大鼠部分卵母细胞巢和原始卵泡的卵母细胞核内和胞浆高表达, 且在出生 2 d 后达到高峰, 随后逐渐降低, 推测 Bim 蛋白可能起保护原始卵泡中卵母细胞的作用。

### 1.3.3 Bid 和 Bik 蛋白

在正常的生理条件下 Bid 蛋白以基本不具备诱导活性的形式存在, 可以推测卵泡中的 Bid 蛋白在卵泡凋亡的发生过程中无启动作用, 但当细胞凋亡启动后, Bid 酶解成两个片段后在卵泡的凋亡过程中起促进作用, 提示 Bid 蛋白在卵泡凋亡的发展过程可能发挥一定的协同作用<sup>[18]</sup>。Bik 蛋白在动物及人类卵泡中的表达及作用目前尚未见文献报道。

## 2 Bcl-2 蛋白家族对早期胚胎发育的调节

早期胚胎一般是指从受精到器官原基形成过程中的胚胎。研究证实动物及人类早期胚胎中存在着 Bcl-2、Bcl-XL、Bak 等蛋白的表达, 它们在早期胚胎的生长发育过程中发挥着重要的调节作用<sup>[19]</sup>。

### 2.1 Bcl-2 亚家族对早期胚胎发育的保护作用

李威等<sup>[19]</sup>发现随着小鼠早期胚胎发育的进程, Bcl-2 表达逐渐增加, Bcl-XL 表达逐渐下降; 于月成<sup>[20]</sup>等也发现早期发育终止的胚胎细胞中 Bcl-2 蛋白呈低表达, 说明早期胚胎发育过程中 Bcl-2 蛋白发挥着重要的抑制胚胎凋亡的作用, 而 Bcl-XL 蛋白在早期胚胎的发育过程中可能不发挥主要的调节作用, 他们还发现 Bcl-2 蛋白的下调可能是通过激活 Caspase-3 并裂解 Bcl-2 这一转导途径实现的。古雅丽等<sup>[21]</sup>研究发现: 在发育终止的胚胎绒毛组织细胞中 Bcl-2 蛋白表达量明显下降, 提示 Bcl-2 蛋白可能通过抑制绒毛组织细胞的凋亡来保护早期胚胎的生长发育。张书霞等<sup>[22]</sup>发现 Bcl-2 蛋白在鸡早期胚胎淋巴组织中的表达量以胸腺原基中较高, Bcl-2 蛋白在免疫器官中的表达量与细胞凋亡率之间呈负相关, 表明 Bcl-2 蛋白还可能通过调节免疫功能来保护早期胚胎的生长发育过程。上述资料提示 Bcl-2 蛋白不仅通过对胚胎细胞自身的调节, 还可以通过对绒毛组织、免疫器官等支持组织的调节来实现对胚胎的保护作用。Bcl-W 和 Mcl-1 在植入前人类胚胎中也存在着表达<sup>[23]</sup>, 但它们在早期胚胎发育过程中的作用目前尚无文献报道。

### 2.2 Bax 亚家族对早期胚胎发育的保护作用

李威等<sup>[19]</sup>研究发现在小鼠早期胚胎发育进程中 Bcl-2 蛋白逐渐增加的同时, 还发现促凋亡蛋白 Bax 的表达无明显变化, 而 Bak



表达则逐渐下降,提示在小鼠的正常早期胚胎发育过程中 Bax 蛋白可能较 Bcl-2 蛋白发挥更大的作用。而 Valbuena D 等<sup>[24]</sup>却发现大鼠的早期胚胎发育进程中促凋亡基因 Bax 表达先逐步下降后表达无明显变化,这与李威等研究结果不同,原因可能为:①Bax 蛋白在不同种属动物的早期胚胎的生长发育过程中发挥不同程度的作用;②早期胚胎发展不同阶段 Bax 蛋白发挥作用不同;③Bax 蛋白与其他 Bcl-2 亚家族成员之间相互配合,共同调节胚胎的生长发育;④早期胚胎凋亡的调节决定于 Bcl-2/Bax 的比值,而不是单一的 Bcl-2 蛋白或者 Bax 蛋白的变化。古雅丽等<sup>[21]</sup>在发育终止的早期胚胎的绒毛组织细胞中也发现,绒毛组织细胞中 Bax 蛋白表达量明显增加,说明 Bax 蛋白也能通过调节胚胎绒毛组织的凋亡来发挥对早期胚胎的调节作用。

Bcl-2 蛋白及 BH3 亚家族成员蛋白在早期胚胎中的调节作用目前鲜见文献报道。

### 3 展 望

利用基因突变、基因敲除、RT-PCR 等生物学技术从基因转录和或蛋白表达水平上研究 Bcl-2 蛋白家族成员之间、Bcl-2 蛋白家族与其他调控蛋白之间相互作用、调控机制及其意义仍将是当前探讨 Bcl-2 家族蛋白对女性生殖细胞凋亡影响的研究热点之一。进一步了解 Bcl-2 蛋白家族对卵泡和早期胚胎的调节作用及其机制将可以为女性生殖系统疾病、辅助生殖提供基础研究方向,也可作为临床诊断治疗确定分子靶点的研究提供参考依据。

### 参考文献:

- [1] Hsu SY, Hsueh AJ. Tissue-specific Bcl-2 protein partners in apoptosis: an ovarian paradigm [J]. *Physiol Rev*, 2000, 80(2): 593 - 614.
- [2] Depalo R, Nappi L, Loverro G, et al. Evidence of apoptosis in human primordial and primary follicles [J]. *Hum Reprod*, 2003, 18(12): 2678 - 2682.
- [3] Tsujimoto Y, Croce CM. Analysis of the structure, transcripts, and protein products of Bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83(14): 5214 - 5218.
- [4] Morita Y, Peres GL, Maravei DV, et al. Targeted expression of Bcl-2 in mouse oocytes inhibits ovarian follicle atresia and prevents spontaneous and chemotherapy-induced oocyte apoptosis in vitro [J]. *Mol Endocrinology*, 1999, 13(6): 841 - 850.
- [5] Vaskivuo TE, Anttonen M, Herva R, et al. Survival of human ovarian follicles from fetal to adult life: apoptosis-related proteins, and transcription factor GATA24 [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86(7): 3421 - 3429.
- [6] 周东蕊, 杨利国, 姜勋平, 等. 外源 Bcl-2 基因和脂质体对鸡卵泡颗粒细胞体外分裂和凋亡的影响 [J]. *南京农业大学学报*, 2001, 24(2): 75 - 78.
- [7] Tomic D, Brodie SG, Deng C, et al. Smad3 may regulate follicular growth in the mouse ovary [J]. *Biol Reprod*, 2002, 66(4): 917 - 923.
- [8] Hu XM, Christian P, Sipes JG, et al. Expression and redistribution of cellular Bad, Bax, and Bcl-XL protein associated with VCD2 induced oovotoxicity in rats [J]. *Biol Reprod*, 2001, 65(5): 1489 - 1495.
- [9] Jin X, Han CS, Yu FQ, et al. Anti-apoptotic action of stem cell factor on oocytes in primordial follicles and its signal transduction [J]. *Mol Reprod Dev*, 2005, 70(1): 82 - 90.
- [10] Johnson AL, Bridgham JT, Woods DC. Cellular mechanisms and modulation of activin A- and transforming growth factor beta-mediated differentiation in cultured hen granulosa cells [J]. *Biol Reprod*, 2004, 71(6): 1844 - 1851.
- [11] Hartley PS, Bayne RAL, Robinson LL, et al. Development changes in expression of Myeloid Cell Leukemia 1 in human germ cells during oogenesis and early folliculogenesis [J]. *Endocrinol Metab*, 2002, 87(7): 3417 - 3427.
- [12] Perez GI, Jurisicova A, Wise L, et al. Absence of the proapoptotic Bax protein extends fertility and alleviates age-related health complications in female mice [J]. *2007*, 104(12): 5229 - 5234.
- [13] Kugu K, Ratts VS, Piquette GN, et al. Analysis of apoptosis and expression of bcl-2 gene family members in the human and baboon ovary [J]. *Cell Death Differ*, 2005, 5(6): 67 - 76.
- [14] Benifla JL, Sifer C, Bringuier AF, et al. Induced apoptosis and expression of related proteins in granulosa cells from women undergoing IVF: a preliminary study [J]. *Hum Reprod*, 2002, 17(4): 916 - 920.
- [15] Lim SF, Chuan KH, Liu S, et al. RNAi suppression of Bax and Bak enhances viability in fed-batch cultures of CHO cells [J]. *Metab Eng*, 2006, 8(6): 509 - 522.
- [16] Leo CP, Hsu SY, Chun SY, et al. Characterization of the antiapoptotic Bcl-2 family member myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1) and the stimulation of its message by gonadotropins in the rat ovary [J]. *Endocrinology*, 1999, (140)12: 5469 - 5477.
- [17] 隋旭霞, 傅玉才, 罗丽莉, 等. Foxo3a 转录因子参与卵母细胞的凋亡 [J]. *中国现代医学杂志*, 2007, 17(12): 1438 - 1441.
- [18] Yadav VK, Lakshmi G, Medhamurthy R, et al. Prostaglandin F2alpha-mediated activation of apoptotic signaling cascades in the corpus luteum during apoptosis: involvement of caspase-activated DNase [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(11): 10357 - 10367.
- [19] 李威, 王连卿, 苏静艳, 等. 小鼠早期胚胎发育过程中细胞凋亡及凋亡基因表达的检测 [J]. *细胞生物学杂志*, 2006, 28(4): 596 - 602.
- [20] 于月成, 高晓康, 辛晓燕, 等. 早期胚胎发育终止绒毛中 Bcl-2 和 caspase-3 表达的变化 [J]. *解放军医学杂志*, 2004, 6(6): 478.
- [21] 古雅丽, 崔豫琳, 邹芳, 等. 胚胎停止生长绒毛细胞凋亡研究 [J]. *医药论坛杂志*, 2005, 26(8): 24 - 26.
- [22] 张书霞, 陈万芳, 于勇. Bcl-2 基因在成年和胚胎鸡免疫器官及其与细胞凋亡的关系 [J]. *南京农业大学学报*, 1999, 22(4): 65 - 68.
- [23] Metcalfe AD, Hunter HR, Bloor DJ, et al. Expression of 11 members of the Bcl-2 family of apoptosis regulatory molecules during human preimplantation embryo development and fragmentation [J]. *Mol Reprod Dev*, 2004, 68(1): 35 - 50.
- [24] Valbuena D, Martin J, dePablo JL, et al. Increasing levels of estradiol are deleterious to embryonic implantation because they directly affect the embryo [J]. *Fertil Steril*, 2001, 76(5): 962 - 968.