

哺乳动物颗粒细胞凋亡研究进展

王星^{1,2}, 罗光彬^{*}, 刘永¹, 肖焕星¹, 姜卓¹

(1. 沈阳农业大学动物胚胎工程实验室, 辽宁沈阳110161; 2. 辽东学院动物科学系, 辽宁丹东118003)

摘要 细胞凋亡是雌性生殖系发育过程中的一个重要组成部分, 在哺乳动物中, 超过99%的雌性生殖细胞都会在卵子发生的不同阶段发生凋亡。目前, 在颗粒细胞凋亡过程中至少发现5个配体受体系统: TNF α 和TNF受体系统, Fas配体受体系统, TRAIL和TRAIL受体系统, APO3配体受体系统, PFG5配体受体系统, 而且发现颗粒细胞凋亡属于依赖于线粒体凋亡信号传导凋亡途径。

关键词 卵泡闭锁; 颗粒细胞; 凋亡; 机理; 配体受体系统

中图分类号 Q954.48 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)12-03554-02

Research Advance in the Granulosa Cell Apoptosis of Mammal

WANG Xing et al (Laboratory of Animal Embryo Engineering, Shenyang Agriculture University, Shenyang, Liaoning 110161)

Abstract Apoptosis is a fundamental life phenomenon during the development of various organisms. Germ cell apoptosis also occurs in many kinds of animals. Apoptosis is essential to the female germ development. In mammalian ovaries, more than 99% of follicles undergo a degenerative as "Atresia". To date, at least five cell death ligand-receptor systems have been reported in granulosa cells: TNF α and receptors, Fas ligand and receptors, TRAIL(APO2) and receptors, APO3 ligand and receptors, and PFG5 ligand and receptors. Moreover, it has been showed that the granulosa cell is type apoptotic cell, which has the mitochondrion dependent apoptosis-signaling pathway.

Key words Follicular atresia; Granulosa cell; Apoptosis; Mechanism; Ligand-receptor system

细胞凋亡(Apoptosis)是一种由基因控制的细胞自主性死亡方式, 是一种主动的、程序性的、细胞固有的生物学过程, 又称细胞程序性死亡(PCD); 是1972年由Kerr教授根据形态学特征首先提出的^[1]。细胞凋亡与组织器官的发育, 机体正常生理活动的维持, 某些疾病的发生以及细胞恶变等过程均有关^[2]。在哺乳动物的卵巢中卵泡闭锁是十分普遍的现象, 除少量卵泡可以发育成熟排卵外, 其余大部分卵泡都将闭锁退化。研究表明颗粒细胞凋亡是导致卵泡闭锁的重要原因^[3], 并先后在多种动物身上得到证实。

颗粒细胞凋亡的调节, 同其他细胞凋亡既有相似之处, 同时也具有其特有的调控因素和调控模式。凋亡可由影响卵泡发育的其他因素和信号传导机制来引发, 也受旁分泌和自分泌及死亡基因和肿瘤基因之间的相互影响, 这些可能是决定颗粒细胞命运的主要因素^[4]。

1 颗粒细胞凋亡

卵巢中绝大部分卵泡在发育的各个阶段逐渐退化, 称为卵泡闭锁。目前认为细胞凋亡为卵泡闭锁的主要机制, 卵泡闭锁主要是由颗粒细胞凋亡引起的, 颗粒细胞出现凋亡的典型特征^[5]。主要表现为: 染色质固缩, 常聚集于核膜, 呈境界分明的颗粒块状或新月形小体; 细胞浆浓缩; 凋亡小体形成。从闭锁卵泡的颗粒细胞中分离出的DNA片段在电泳下形成明显的梯度图案, 这是细胞凋亡的特殊标志之一。由于卵泡闭锁时个体年龄及卵泡发育阶段的不同, 形成闭锁的具体过程可能不一样, 但它们在闭锁早期的机制均为颗粒细胞的凋亡。在体外培养过程中, 颗粒细胞也存在凋亡现象^[6]。

2 死亡配体受体系统

颗粒细胞凋亡属于依赖于线粒体凋亡信号传导凋亡途径。在颗粒细胞凋亡过程中至少发现5个死亡配体受体系统。

2.1 Fas及FasL系统 Fas也称APO1, 或CD95, 是肿瘤坏死因子(TNF)和神经生长因子受体(NGF)家族的细胞表

面分子, 是FasL的受体。FasL是肿瘤坏死因子(TNF)家族的细胞表面分子。

Fas的分子量为45000, 属于I型跨膜蛋白。Fas分子中至少有3个与细胞凋亡诱导功能密切相关的结构域, 分别是细胞膜外区域(EXT)、死亡结构域(DD)和调控区(RR)。虽然TNF/NGFR家族成员中EXT的氨基酸序列是相对保守的, 但相互之间并无明显的交叉反应性, Fas的EXT只能结合抗Fas抗体或FasL。DD为传导细胞死亡信号所必需, 若该区氨基酸序列发生突变、缺失等变化, Fas的细胞凋亡诱导功能则随即丧失。Fas羧基末端有15个氨基酸组成的调控区(RR), 可结合一种与Fas功能相关的磷酸酶, 并由此抑制Fas诱导细胞凋亡的作用。

FasL是一个分子量为31000的I型跨膜蛋白, 即它的N末端位于胞浆内, C末端延伸至细胞外空间, 胞外区约由150个氨基酸组成。FasL编码基因位于Iq23。

FasL或抗Fas抗体与Fas结合可导致携带Fas的细胞凋亡^[7]。研究表明, 多种哺乳动物细胞可表达Fas和FasL。应用促性腺激素技术诱发大鼠卵泡闭锁实验模型, 结果证实Fas和FasL均存在于卵巢颗粒细胞中^[8]。利用RT-PCR(逆转录聚合酶链式反应)技术和用蛋白印迹初步的实验分析表明, 在健康的和闭锁的猪颗粒细胞中均有Fas和FasL的mRNA的表达^[9]。而且用免疫组化方法标记蛋白证明, 无论是健康卵泡还是闭锁卵泡, Fas位于颗粒细胞胞质部位而不是位于细胞表面^[10]。Fas介导细胞凋亡的调控途径是^[11]: FasL与Fas结合可以导致Fas胞内的死亡域形成三聚体而活化, 并引起与之结合的FADD构象改变, 使caspase-8前体集聚、断裂和激活, 产生有活性的caspase-8, 从而激发一系列下游的caspase级联反应, 诱发细胞凋亡。这是一条基本的通过DD和FADD(接头蛋白)的细胞凋亡调控途径。

2.2 TNF α 和TNF受体系统 TNF α (肿瘤坏死因子 α)最初被认为是巨噬细胞的产物, 17.3 kD的蛋白质, 不但能诱发细胞死亡, 还能诱发细胞增殖。TNF α 的不同作用通过特殊的细胞表面受体TNFR1(55~60 kD)或TNFR2(75~80 kD)实

作者简介 王星(1972-), 男, 辽宁丹东人, 在读硕士, 讲师, 从事动物繁殖与生物技术方面的研究。* 通讯作者, 博士, 教授, E-mail: luoguangbin@126.com。

收稿日期 2006-12-13

现^[12]。TNF α 的 TNFR1 - TRADD - FADD - caspase-8 信号传导途径能引起细胞凋亡;而 TNFR1 - TRADD - RIP - TRAF2 信号传导途径则能作为抗凋亡(存活/增殖)因子^[13]。通过 TNFR1 引起凋亡的途径为:TNF α 与 TNFR1 的死亡结构域(DD)相连接,死亡结构域(DD)与另一接头蛋白 FADD 连接,FADD 激活 caspase 起始因子 caspase-8 引起 caspase 级联反应而引发细胞凋亡。在体外培养来自于猪卵巢大卵泡的颗粒细胞过程中发现,TNF α 既能诱发细胞增殖,也能诱发细胞死亡。用组织化学的方法分析在猪的卵巢闭锁过程中颗粒细胞中 TNF α 信号蛋白(TNF α 、TNF 受体 T 和 TRAF2),利用 RT-PCR 技术和原位杂交实验分析了 TNF α 信号蛋白在猪颗粒细胞中的定位和 mRNA 的表达,而且在卵巢卵泡闭锁早期,颗粒细胞层出现 TNFR2 强烈免疫染色。表明在猪卵巢闭锁过程中 TNF α 是作为颗粒细胞存活因子^[13]。现在在多种动物的卵母细胞、巨噬细胞、颗粒细胞都得到证明^[14]。实验表明对 TNF α 在体外培养卵巢细胞有多种影响,如可抑制颗粒细胞 FSH、LH、P 的分泌^[15],1 ng/ml 的 TNF α 对体外培养的新生小鼠卵巢的卵泡及卵母细胞有诱导凋亡的作用^[16]。

2.3 TRAIL 和 TRAIL 受体系统 TRAIL(肿瘤坏死基因相关的凋亡诱导配体)是肿瘤坏死基因家族(TNF)成员,也属于典型的 III 型跨膜蛋白,与 TNF 家族的其他成员相比,TRAIL 含有一个 12~16 个氨基酸特异序列插入形成的特殊的延长环,其结构和功能与 TNF 家族的另一成员 Fas(APO1)相似,所以又称 APO2。

在 TNFR 家族,受体在细胞外的 N 末端有几个半胱氨酸结构域,将 TNFR 家族受体分为 2 种,有死亡结构域(DD)的受体(DRs)称死亡受体,包括 TNFR1、Fas、DR3(APO3)、DR4(TRAILR1)、DR5(TRAILR2)和 DR6。死亡结构域与每个受体偶联引起 caspase 级联反应引发凋亡。现在又有 TNFR 同系物被发现命名为 DcR(“诱导”受体),作为诱发凋亡的信号。在 TNFR 家族的 DcR 包括 DcR1(TRAIL3)、DcR2(TRAIL4)、OPG(骨保护素)、DcR3 和 PFG6。

体外研究表明,TRAIL 既能引起细胞凋亡导致细胞死亡,也能诱发细胞增殖。通过 TRAIL 和 TRAIL 受体系统传导死亡信号途径是:TRAIL 与细胞外的活性受体(DR4 或 DR5)结合,受体细胞内的死亡结构域与修饰子蛋白(TRADD)连接,TRADD 的死亡结构域与另一接头蛋白(FADD)连接,FADD 激活 caspase 起始因子 caspase-8 引起 caspase 级联反应而引发细胞凋亡^[17]。

用组织化学方法检验 TRAIL 及其受体在猪卵巢的定位,RT-PCR 和原位杂交方法表明 TRADD 只在闭锁和卵泡的颗粒细胞中有表达,TRAIL 及其受体(DR4、DR5 和 DcR1)与诱导卵巢卵泡闭锁过程中颗粒细胞凋亡有关,DcR1 在颗粒细胞凋亡过程中起抑制作用^[18]。

2.4 PFG-5 配体受体系统 基于生物化学和免疫组化的发现,杂交瘤细胞系的 PFG5 和 PFG6 抗原与已知的细胞凋亡的间接受体 Fas 或 TNFR1 不同,推测 PFG5 抗原作为细胞死亡受体在颗粒细胞特异表达,PFG6 抗原作为 PFG5 抗原的诱导受体诱导凋亡信号穿过 PFG5 抗原^[19-20]。细胞死亡受体传递细胞凋亡信号,诱导受体作为细胞死亡受体的调整基

因,它们均在同一颗粒细胞表达,因此认为颗粒细胞表面的诱导受体的过度表达通过凋亡受体抑制了细胞凋亡信号的诱导,但这个受体系统还没有最终研究清楚。

2.5 其他细胞死亡配体(或)受体系统 体外培养研究表明还有其他受体如加压素型受体、促性腺激素受体等。Bcl-2 家族的一些成员在颗粒细胞都有调控细胞凋亡、影响 caspase 级联反应途径的机能,如 Bcl-2 家族的 Bcl-2、Bcl-xL、Bcl-xS 等。

3 结语

自 20 世纪 90 年代发现哺乳动物的细胞凋亡基因以来,细胞凋亡的研究引起了广大生物医学工作者的兴趣,成为当今生物学研究热点之一,揭示颗粒细胞凋亡的机理仍在进一步研究之中。

参考文献

- [1] KERR J F R, WYLIE A H, CURRIE A R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with varying implications in tissue kinetics[J]. *Br J Cancer*, 1972, 26: 239.
- [2] THOMPSON C B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease[J]. *Science*, 1995, 267: 1456.
- [3] BYSKOV A G. Follicular atresia[C]// JONES RE. *The Vertebrate Ovary*. New York: Plenum Press, 1978: 533-562.
- [4] VASKIVUO T E, ANTONEN M, HERA R, et al. Survival of human ovarian follicles from fetal to adult life: apoptosis, apoptosis-related proteins, and transcription factor GATA-4[J]. *Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86(7): 3421.
- [5] EVANS ACO. Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals[J]. *Reprod Dom Anim*, 2003, 38: 240-246.
- [6] IKEDA S, IMAI H, YAMADA M. Apoptosis in cumulus cells during in vitro maturation of bovine cumulus-enclosed oocytes[J]. *Reproduction*, 2003, 125: 369-376.
- [7] SHIGEKAZU N. Apoptosis by death factor[J]. *Cell*, 1997, 88: 355-365.
- [8] JONG MNK, DAMD L B, ANTHONY A, et al. Granulosa cell apoptosis induced at the penultimate stage of follicular development is associated with increased levels of Fas and Fas ligand in the rat ovary[J]. *Biology of Reproduction*, 1998, 58: 1170-1176.
- [9] INOUE N, MANABE N, MASISU T, et al. Roles of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand signaling pathway in granulosa cell apoptosis during atresia in pig ovaries[J]. *Reprod*, 2003, 49: 313-321.
- [10] KOMAISU K, MANABE N, KISO M, et al. Stute Fas(FasB) regulates luteal cell apoptosis during luteolysis in murine ovaries[J]. *Mol Reprod Dev*, 2003, 65: 345-352.
- [11] STEWART J H, N GUYEND, CHENG G A, et al. Induction of apoptosis in malignant pleural mesothelioma cells by activation of the Fas(Apo21/CD95) death signal pathway[J]. *Thrac Cardiovasc Surg*, 2002, 123(2): 295-302.
- [12] HSU H, XIANG J, GOEDDEL DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF- κ B activation[J]. *Cell*, 1995, 89: 495-504.
- [13] NAKAYAMA M, MANABE N, INOUE N, et al. Changes in the expression of tumor necrosis factor(TNF α), TNF α receptor(TNFR)2, and TNFR-associated factor 2 in granulosa cell during atresia in pig ovaries[J]. *Biol Reprod*, 2003, 68: 530-535.
- [14] MARINKIEWICZ J L, KRISHNA A, CHEUNG M Y, et al. Oocyte tumor necrosis factor- α localization in the neonatal ovary and throughout development in the adult rat[J]. *Biol Reprod*, 1994, 50: 1251-1260.
- [15] TERRAVIVA PF. Potential roles of tumor necrosis factor- α in follicular development, ovulation, and the lifespan of the corpus luteum[J]. *Domest Anim Endocrinol*, 1997, 14: 1-15.
- [16] LEISA J MORRISON, JENNIFER L, MARINKIEWICZ. Tumor necrosis factor α enhances Oocyte/Follicle apoptosis in the neonatal rat ovary[J]. *Biology of Reproduction*, 2002, 66: 450-457.
- [17] KISCHEL F C, LAWRENCE D A, CHUNIHARAPAI A, et al. Apo-2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase 8 to death receptors 4 and 5[J]. *Immunity*, 2000, 12: 611-620.
- [18] WADA S, MANABE N, NAKAYAMA M, et al. TRAIL decoy receptor-1 disappears in granulosa cell of atretic follicles in porcine ovaries[J]. *Vet Med Small Anim Clin*, 2002, 97: 435-439.
- [19] ASKENAZI A, DIXT V M. Death receptors: signaling and modulation[J]. *Science*, 1998, 281: 1305-1308.
- [20] ASKENAZI A, DIXT V M. Apoptosis control by death and decoy receptors[J]. *Gr Opi Gll Biol*, 1999, 11: 255-260.