

卵巢低氧微环境调节哺乳动物排卵的分子机制

杨芳¹, 张宝云¹, 冯光德², 向伟¹, 马云霞¹, 陈航¹, 储明星³, 王凭青¹

1. 重庆大学生物工程学院, 重庆 400030;

2. 四川铁骑力士牧业科技有限公司, 绵阳 621000;

3. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 中国农业科学院家养动物遗传资源与种质创新重点开放实验室, 北京 100193

摘要: 哺乳动物排卵过程复杂, 包括卵泡发育、卵泡成熟破裂后的排卵以及黄体形成和退化等过程。目前研究表明, 排卵过程受低氧微环境和响应低氧条件的因子—低氧诱导因子(Hypoxic inducible factor, HIF)的影响。低氧调控 HIF 并影响许多生理过程, 如血管生成、炎症反应等。尽管排卵的具体过程早已阐明, 但低氧参与调控排卵过程的分子机制并不十分清楚。本文主要综述了哺乳动物在排卵过程中低氧环境如何产生以及 HIF 如何调控该过程的分子机制, 旨在进一步理解排卵机制和卵巢的综合性功能, 为相关的卵巢疾病提供一定的理论依据。

关键词: 哺乳动物; 排卵; 低氧微环境; 低氧诱导因子

A mechanistic review of how hypoxic microenvironment regulates mammalian ovulation

Fang Yang¹, Baoyun Zhang¹, Guangde Feng², Wei Xiang¹, Yunxia Ma¹, Hang Chen¹, Mingxing Chu³, Pingqing Wang¹

1. College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400030, China;

2. Sichuan TQLS Animal Husbandry Science and Technology Co.LTD, Mianyang 621000, China;

3. Key Laboratory of Farm Animal Genetic Resources and Germplasm Innovation of Ministry of Agriculture, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

Abstract: Mammalian ovulation is a complicated process that includes development of follicles, ovulation, formation of corpus luteum and luteolysis. The three different stages of the ovulation activity are affected by hypoxic microenvironment and hypoxia-induced factors (HIF), which play a crucial role in physiological processes, such as angiogenesis and inflammation. Although the process of ovulation has been well elucidated, the molecular mechanism regulated by hypoxia needs an in depth study. In this review, we summarize how hypoxic and HIF regulate gene expression during mammalian ovulation in order to provide a better understanding of ovulation mechanism, which may lay a theoretical basis for prevention and therapy of various ovarian diseases.

收稿日期: 2015-06-23; 修回日期: 2015-09-08

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(编号: 31372287), 国家发改委重大专项(编号: 2014-2573), 国家科技重大专项项目(编号: 2014ZX0800952B)和中国农业科学院科技创新工程(编号: ASTIP-IAS13)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31372287), the National Biological Breeding Capacity Building and Industrialization Projects (No. 2014-2573), the Ministry of Agriculture Transgenic Major Projects of China (No. 2014ZX0800952B) and the Agricultural Science and Technology Innovation Program of China (No. ASTIP-IAS13)]

作者简介: 杨芳, 硕士, 专业方向: 分子遗传学。E-mail: yangfangmichelle@sina.com

通讯作者: 王凭青, 博士, 硕士生导师, 研究方向: 分子生物学与基因工程。E-mail: wang_pq@21cn.com

DOI: 10.16288/j.ycz.15-289

网络出版时间: 2015/12/4 13:29:11

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20151204.1329.001.html>

Keywords: mammals; ovulation; hypoxic microenvironment; hypoxia-inducible factors

哺乳动物的排卵过程十分复杂,大体分为激素的产生、卵泡的发育、卵泡成熟破裂后排卵以及黄体的形成和退化,这些过程受诸多因素的影响,包括垂体激素、类固醇、多肽和细胞激素等^[1]。当排卵受阻后,不仅会抑制雌性生殖过程,还可能引起一些卵巢相关的疾病,如多囊性卵巢综合征。早期研究发现,在卵巢内部存在低氧环境,适宜癌细胞生长,这可能是卵巢癌发生的原因之一。然而,深入研究发现低氧几乎参与卵巢内排卵的所有过程,如排卵时脉管系统脱落、黄体形成初期和黄体退化血液流量降低等会造成局部氧密度降低^[2]。这种在排卵过程中由于血液流量变化和脉管系统的重塑而形成的低氧环境,即卵巢低氧微环境。此外,有研究表明,细胞响应低氧条件时受到低氧诱导因子的影响,而该因子在许多生理过程中发挥作用,如新陈代谢、炎症反应等^[3]。这表明在哺乳动物卵巢低氧微环境中,低氧及低氧诱导因子也可能影响排卵事件的发生。本文主要综述了低氧及低氧诱导因子(Hypoxic inducible factor, HIF)如何调节排卵过程及其调控的分子机制。

1 低氧及低氧诱导因子

研究表明,低氧除了对哺乳动物的循环系统、呼吸系统发挥重要的作用^[4],影响肿瘤形成的微环境,从而调控其发育、新陈代谢等外^[5],还能够对哺乳动物的雌性生殖过程起着重要的调节作用。哺乳动物细胞内存在一类介导低氧适应性反应的转录因子,能激活低氧反应性基因的表达,这种维持低氧条件下氧稳态的关键性转录因子,即低氧诱导因子(HIF)^[6]。目前研究表明,HIF 家族包括 HIF-1^[7]、HIF-2^[8]和 HIF-3^[9]。HIF 是二聚体转录因子,包括 1 个 α 亚基和 1 个 β 亚基—芳香烃受体核转运蛋白(Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, ARNT)^[10],其中 α 亚基(HIF-1 α 、HIF-2 α 和 HIF-3 α)为低氧调控主要亚基,而 β 亚基则对低氧不敏感。HIF 的 3 个 α 亚基蛋白结构具有一些相似的组成^[11~14](图 1A)。

HIF 蛋白发挥作用依赖于该蛋白的稳定性^[10],其主要的机制是:在正常氧条件下,HIF- α 自身

的转录和翻译正常进行,但脯氨酰羟化酶(Prolyl hydroxylase enzymes, PHDs)家族包括 PHD1、PHD2 和 PHD3,作用于 HIF- α 蛋白 ODD(Oxygen-dependent degradation domain)结构域中脯氨酸位点(如 HIF-1 α ^{P402} 和 HIF-1 α ^{P564},HIF-2 α ^{P405} 和 HIF-2 α ^{P531})使其羟化^[4,15]。羟化后的 HIF- α 通过 E3 泛素化连接酶发生泛素化,泛素连接酶复合体的组分—Von Hippel-Lindau 肿瘤抑制蛋白(The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein, pVHL)—可以对 E3 泛素化连接酶进行识别,促使 HIF- α 蛋白与 pVHL 结合,进一步通过蛋白酶体快速降解,导致 HIF 蛋白维持在本底水平,不能正常发挥作用^[10](图 1B);反之,在低氧条件下,由于缺乏 PHDs 反应基质,HIF- α 蛋白羟化过程受阻,降低 pVHL 对泛素化酶识别,HIF- α 蛋白结构稳定并逐渐富集,与 β 亚基形成二聚体后发挥作用。最近研究发现^[4],低氧条件下 SUMO-specific protease1 (SEN1)在 E3-pVHL 复合物促进 HIF-1 α 稳定性中发挥重要作用。低氧除了能够调节 HIF- α 蛋白的稳定性外,还能影响其转录活性。HIF- α 羧基端转录活性区域独立于 ODD,并能在低氧条件下结合组蛋白乙酰转移酶共同活化因子复合物 CBP/P300 增加 HIF 转录活性。在正常氧浓度下,天冬酰胺羟化酶能结合到 HIF 抑制结构域(IH)上,使位于 HIF- α CTAD (C terminal activation domain)天冬酰胺残基(HIF-1 α ^{N803} 和 HIF-2 α ^{N851})^[4]羟化,阻碍 HIF- α 与 CBP/P300 转录活化因子、RNA 聚合酶 (Pol)之间的结合。Chen 等^[16]研究发现 HIF 的低氧性 CTAD 的诱导是通过对 CTAD 内保守性天冬酰胺羟化抑制过程来实现的。低氧条件下,特异性阻断天冬酰胺羟化,可使 CTAD 和共同转录活化因子 CBP/P300 相互作用,以丙氨酸代替天冬酰胺,则可使 P300 有较强的转录活性。Cockman 等^[17]研究发现,即使 HIF- α 蛋白处于稳定状态,激活天冬酰胺羟化酶也能有效地抑制 HIF 的转录活性。相反,在低氧条件天冬酰胺羟化作用受阻,CBP/P300 与 pol 、HIF- α 结合诱导其转录,从而有助于 HIF 表达。因此,HIF 发挥作用时依赖于对脯氨酸残基及天冬酰胺残基羟化的阻断^[10,17]。

在应对低氧环境的过程中,HIF 调节其靶基因

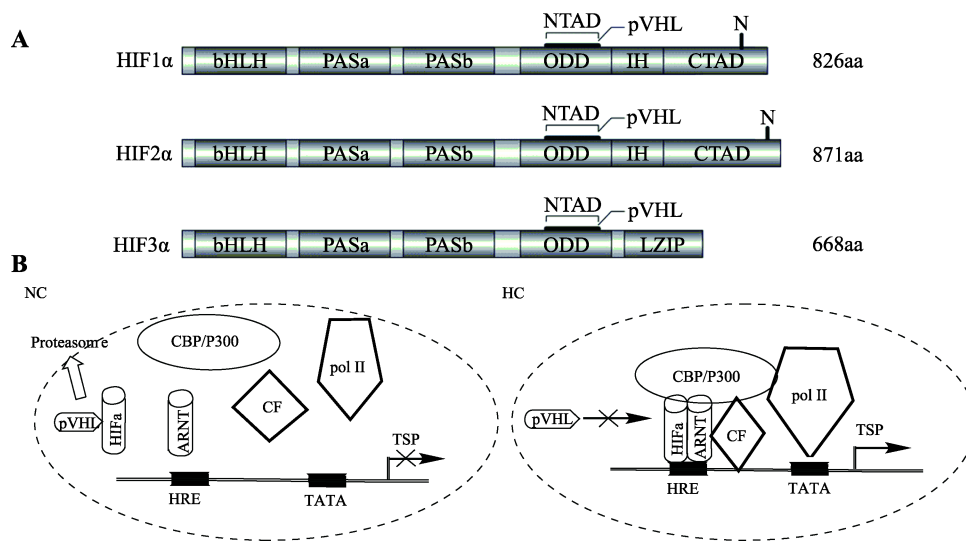


图1 人 HIF- α 蛋白质结构及 HIF 发挥作用的机制

Fig. 1 The protein structure and mechanism of human HIF- α

A: 人 HIF 家族蛋白质结构。bHLH: 碱性多肽-螺旋-环-螺旋; PASa、PASb: β 亚基结合位点; ODD: 氧依赖性降解结构域; NTAD: 氨基端反式激活域; pVHL: 脯氨酸羟化酶复合体的组分 Von Hippel-Lindau 肿瘤抑制蛋白; CBP/p300: 组蛋白乙酰转移酶共同活化因子复合物; CF: 辅因子; pol II: RNA 聚合酶; HRE: 低氧响应元件; TATA: TATA 盒; Proteasome: 蛋白酶体; TSP: 转录。

时,除了受自身结构上的调控之外,还需要响应元件的存在。李启芳等^[6]在对人肝癌 Hep3B 细胞进行低氧处理后,检测 HIF-1 的作用时发现细胞内的红细胞生成素(Erythropoietin, EPO)mRNA 显著性增加。在具体的机制分析中发现, HIF 通过与目的基因低氧响应元件(Hypoxia responsive element, HRE)结合,进而调节其表达。对响应元件突变后,低氧诱导因子调控的靶基因表达降低,这说明其发挥作用需要 HRE 的参与。Zhao 等^[18]研究表明,虽然 HIF-1 能与其调控的目的基因上的 HRE 结合,但目的基因响应低氧时,这些低氧响应元件并不是都发挥作用。这可能是由于 HIF 需要对功能性或非功能性的 HRE 进行识别,而这些功能性的 HRE 是除了能与 HIF 结合的微小 DNA 域外,还往往包含邻近的转录因子结合位点的序列,其与 HIF 结合发挥作用具有组织或基因特异性。HRE 在大多数物种中都是高度保守的,序列为 A(G)CGTG。目前研究表明有 200 多个目的基因受 HIF 的调控,如 *EPO*、*VEGF* 和 *Adams1* 等^[10]。此外,辅因子在这个过程中起着重要的作用。以 HIF-1 α 调控目的基因为例: Pawlus 等^[19]研究发现,在低氧条件下信号传感激活转录因子 3(Signal Transducer and Activator of Transcription 3, STAT 3)对内源性

HIF-1 α 激活靶基因起促进作用。HIF-1 α 和 STAT3 相互结合作用于其特定靶基因的启动子区域,在 HEK293T 细胞中进行检测, HIF-1 α 靶基因 *PGK1* 和 *CA9* 显著性上调。干扰或使用抑制剂处理 STAT3 时, HIF-1 α 靶基因表达下降,表明在 HIF-1 α 调控靶基因的过程中,辅因子 STAT3 发挥了重要的调节作用(图 1B)。HIF-2 α 调控靶基因时,上游激活因子 2(Upstream stimulatory factor 2, USF2)也能发挥同样的作用机制^[20,21]。

2 低氧对哺乳动物排卵过程的影响

2.1 低氧对排卵过程中激素生成的影响

哺乳动物在排卵过程中,由垂体分泌的促卵泡激素(Follicle stimulating hormone, FSH)、促黄体激素(Luteinizing hormone, LH)刺激而产生的类固醇激素(雌激素和孕酮)对卵巢功能的发挥起着重要作用。其中,雌激素能影响卵巢发育和卵泡成熟^[22],而孕酮则影响排卵过程、黄体的形成与退化^[3]。卵巢中卵母细胞的发育伴随颗粒细胞的形成,血液流动被限制在卵泡内膜。卵泡发育成熟后脱离卵泡壁导致脉

管系统脱落, 以及黄体形成时脉管系统的重塑都会降低氧浓度。因此卵泡的发育、成熟、排卵以及随后的黄体早期发育都将处于局部低氧或缺氧的条件下^[23]。

低氧能够以不同的方式影响雌激素和孕酮的产生。首先, 在卵巢低氧微环境中, 通过丘脑—垂体—类固醇生成(Hypothalamic-pituitary-steroidogenic, HPS)轴调控^[24]抑制下丘脑神经递质血清素(Hypothalamic neurotransmitter serotonin, 5-HT)和促性腺释放激素 I(Gonadotropin-releasing hormone-I, GnRH-I)的合成, 降低 LH 的产生, 进而增加 3β 羟化类固醇脱氢酶(3β -hydroxysteroid dehydrogenase, 3β -HSD)、细胞色素 P450 侧链剪切酶(Cytochrome P450 side-chain cleavage, P450scc 或 CYP11A1)的活性, 抑制芳香化酶(P450aromatase, CYP19)的表达, 从而调节孕酮和雌激素的产生。类固醇生成调节蛋白(Steroidogenic acute regulatory protein, StAR)、CYP11A1(将胆固醇转化为孕烯醇酮和 3β -HSD)、 3β -HSD(孕烯醇酮转化为孕酮)^[25]是孕酮生物合成的关键蛋白和酶。而 CYP19 是雌激素合成的关键酶, 能使从膜细胞释放后到达颗粒细胞中的雄激素转变成雌二醇(Estradiol, E2)^[26], 从而调节卵泡的发育。这说明卵巢的低氧微环境可以通过垂体激素直接影响孕酮和雌激素的产生来影响排卵过程。其次, 低氧能够直接调控类固醇合成的转录因子和酶^[27]: 低氧条件下, *HIF* 表达升高抑制 CYP19 的活性, 增加 StAR、 3β -HSD 和 CYP11A1 的表达。同时, Fadhill 等^[25]研究也发现, 在牛科动物的黄体细胞中, 低氧能够调节 StAR、CYP11A1 和 3β -HSD 的活性并影响孕酮的合成。这些研究表明低氧环境对排卵过程中孕酮和雌激素的产生是必不可少的条件。在哺乳动物排卵过程中, 雌激素主要通过其组分雌二醇发挥作用^[28]。雌二醇的分泌呈现明显的周期性变化, 而其消长规律与孕酮的合成相反。在卵泡发育早期, 血浆中雌激素水平很低。伴随卵泡在 FSH、LH 作用下逐渐发育, 颗粒细胞增生, 雌激素分泌增加, 在排卵前到达峰值, 从而引起 LH 峰刺激排卵, 排卵后雌激素分泌减少。而孕酮的生成规律与雌激素相反, 排卵前一直处于低水平, 在排卵后 LH 的作用下, 颗粒细胞黄体化, 孕酮分泌增加, 直到黄体退化前(图 2)。

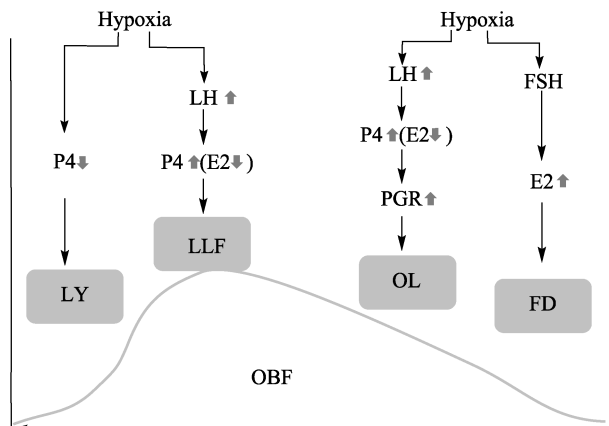


图 2 排卵周期中低氧对激素与受体的影响

Fig. 2 Hormone and receptors are affected by hypoxic in cycle of ovulation

OBF: 卵巢血流量的变化; P4: 孕酮; FD: 卵泡发育; OL: 排卵; LLF: 黄体化及黄体形成; LY: 黄体退化。

2.2 低氧对卵泡发育的影响

卵泡发育离不开血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)^[29], VEGF 能影响卵泡周围血管床的形成^[17]。除此之外, 在卵泡发育的过程中, FSH 也发挥着决定性的作用, 其与 G 蛋白结合的 FSH 受体结合, 调节相应因子的分布并诱导卵泡发育成熟^[30]。

研究发现, *HIF-1 α* 在哺乳动物卵泡发育中会通过 VEGF 促进血管的生成^[3]。卵泡发育过程中, 卵泡发育前的窦状卵泡期氧浓度处于正常水平, 当优势卵泡发育成熟时, 周围膜细胞层中血管的密度减小, 氧浓度降低。激活促性腺激素、低氧诱导因子及血红蛋白等信号因子, 将在卵泡发育窦状期维持正常氧环境和在卵泡发育成熟期维持短暂的低氧环境^[31,32]。Zimmermann 等^[33]研究发现 FSH 刺激 VEGF 表达时会增加卵泡的大小, 而抑制 VEGF 会阻碍窦状卵泡的形成、类固醇生成及膜血管化的产生。这表明 *HIF1-VEGF* 通路对卵泡发育作用重大^[2,3]。在这个过程中, FSH 结合其受体增加 cAMP 的量并活化蛋白激酶 A, 进一步激活 cAMP 响应元件结合蛋白, 并通过抑制 ERK 络氨酸磷酸酶来激活 ERK1/2。同时, 也刺激了磷脂酰肌醇-3 激酶(Phosphatidylinositol-3, PI3K)/蛋白激酶 B(Protein kinase B, PKB 或者 AKT)通路。此前研究证实^[30], PI3K/AKT 信号通路是卵

泡发育过程的重要一部分, FSH 调控 PI3K/AKT 信号通路并活化下游因子有助于卵泡发育成熟。在此基础上, 发现哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(Mammalian target of rapamycin, mTOR)也能受 FSH 调节的 PI3K/AKT 信号通路调控。Semenza 等^[34-36]进一步研究发现, FSH 通过 PI3K 信号通路, 调节多个靶基因(如 *mTOR*、*MDM2* 等)对 HIF1 信号通路进行刺激, 增加其转录活性从而调控 *VEGF*。说明在卵泡发育的低氧微环境中, *HIF-1 α* 是 FSH 调控的 PI3K/AKT/mTOR 信号通路、促进卵泡发育成熟的一个重要调节因子。

此外, 活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 尤其是过氧化氢能够在低氧条件下作为信号分子促进卵泡的发育^[37]。研究证实在大鼠的卵泡发育时, FSH 和低氧会刺激 ROS 的积累^[38]。同时, Grasselli 等^[37]研究也表明氯化钴模拟低氧时能够刺激 ROS 的产生, 从而促进卵泡中颗粒细胞的增殖和 VEGF 的表达(图 3)。

2.3 低氧对排卵过程中卵泡破裂的影响

排卵是卵巢中卵泡破裂和成熟卵子释放的过程。低氧环境产生于排卵滤泡液中, 卵泡滤液中氧浓度降低后随之卵泡将释放。然而, 在促性腺激素诱导发育卵泡中颗粒细胞增殖的过程中, 颗粒细胞内壁缺乏脉管系统导致氧浓度降低, 从而形成了一个卵泡低氧环境, 直到黄体初期^[2,31]。

在哺乳动物中, 排卵的发生是下丘脑—垂体—卵巢轴激素协调控制的结果。从垂体中释放 FSH 和 LH 刺激初级卵泡的生长和成熟, 进而发育至排卵前的卵泡阶段。卵泡发育成熟后分泌高浓度的雌激素, 刺激垂体分泌 LH 形成 LH 峰, 并启动排卵过程, 最终刺激可受精卵子的释放。在此过程中, 甾醇激素孕酮与其受体(Progesterone receptor, PGR)发挥主要作用^[39]。免疫组化分析发现 PGR 在卵巢的颗粒细胞、膜细胞及黄体细胞等部位都有表达, 使用其抑制剂 RU486 和 CDB-2914 时发现小鼠产卵数目明显降低^[40]。在条件性敲除 PGR 的小鼠中也证实卵泡破裂过程受阻。随着 PGR 敲除小鼠的产生, 研究人员对 PGR 及其调控的基因产生了浓厚的兴趣。Kim 等^[39]研究发现, PGR 能调控一些下游靶基因促进卵泡的破裂, 其中包括内皮素 2(Endothelin-2, EDN2)^[41]、氧化物

酶体增殖活化受体 γ (Peroxisoma proliferators activated receptor, ppar γ)^[42]、细胞外基质金属酶(A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin-like motifs-1, Adamts1)^[43]、解聚素金属蛋白酶 8(A disintegrin and metalloprotease 8, ADAM8)^[44]等。在卵子释放中通过 PGR 调控这些靶基因诱导卵泡壁破裂、血管重塑以及炎症反应等过程。有研究报道^[45], PGR 调控靶基因活性时需与靶基因的孕酮响应元件结合, 但具体分析上述的基因时, 发现这些基因并不存在孕酮响应元件^[40]。这说明 PGR 调控这些基因时并不是直接发挥作用, 可能存在中间媒介。有趣的是, Kim 等^[40]和 Sriraman 等^[44]研究表明, 在卵巢的低氧微环境下, 低氧诱导因子 HIF-1 α 能够调控 *EDN2*、*Adamts1*、*ADAM8* 等基因的表达水平, 进而影响各基因在卵泡破裂中的功能。分析这些基因的启动子区域, 发现这些基因的启动子区域都存在低氧响应元件 HRE。利用荧光试验检测 HRE 突变时, 基因表达显著性下调。后续研究表明, 使用棘霉素处理时, 不仅抑制了排卵过程, 而且 *HIF-1 α* 调控的 *VEGF*、*EDN2*、*Adamts1* 表达下降。这说明 *HIF-1 α* 能够直接调控这些基因, 因此推测 PGR 可能通过 *HIF-1 α* 调节下游靶基因(图 3)。由于 PGR 存在两种亚型, 在卵巢的低氧微环境中, 二者怎样对下游基因进行调节, 并无相关文献详细阐明其调节的具体机制, 有待进一步证实。

排卵是炎症反应的过程。在这个过程中, LH 诱导黄体卵泡复合物的粘液化和膨胀。Shkolnik 等^[46]研究发现 ROS 发挥类似 LH 的作用, 同时也促进排卵中 *VEGF* 的表达, 使用抗氧化剂时却阻碍了孕酮的产生和排卵过程的发生。在排卵时的低氧环境下, ROS 能否与 HIF-1 发挥作用却未得到证实。最近, Yalu 等^[47]研究首次表明 ROS 在排卵过程发挥作用时受到 HIF-1 α 的调控, 尤其是 H_2O_2 能够增加 *EDN2*、*VEGF* 的表达, 进而促进排卵过程的发生, 这可能会为临床上使用非激素类药物进行避孕提供理论基础。

2.4 低氧对黄体形成和退化的影响

在哺乳动物中, 卵巢内血流量是一个动态变化的过程。电磁探针实验发现排卵后卵巢内的血流量很低, 到达黄体期时增加, 黄体退化时又降低, 因

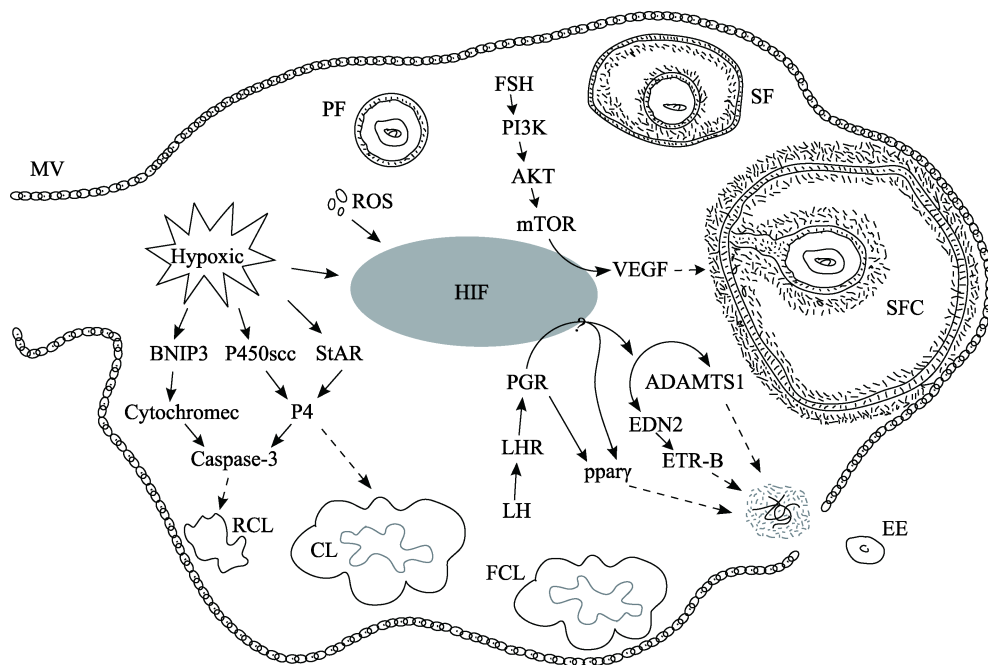


图 3 HIF 调控排卵过程的主要分子机制

Fig. 3 The molecular mechanisms of mammalian ovulation regulated by HIF

MV: 哺乳动物卵巢; PF: 卵巢初级卵泡; SF: 次级卵泡; SFC: 次级有腔卵泡; EE: 卵子; FCL: 发育中黄体; CL: 黄体; RCL: 白体(退化黄体)。

而卵巢内氧浓度也随之呈现动态变化,并在黄体形成初期和退化期形成低氧微环境^[2]。

Reynolds 等^[48]研究发现黄体形成与血管生成相关,随后的研究报道,VEGF 作为一种潜在的血管生成因子受到 HIF-1 α 的调控。通过研究猪^[2]和牛^[49]的黄体颗粒细胞发现, HIF-1 α mRNA 的表达在黄体形成初期增加,这表明 HIF-1 α 可能有助于黄体的形成。在黄体形成初期免疫组化分析表明, HIF-1 α 表达水平显著上调。除此之外,在 HIF-1 α 表达上调的同时,低氧微环境下培养的牛科动物的黄体细胞中 VEGF mRNA 和蛋白水平也显著增加^[50]。最近有研究表明^[40],牛科动物黄体化颗粒细胞在低氧条件下(10%),通过类固醇生成调节 StAR 蛋白的表达,增加孕酮的合成促进黄体形成,进一步表明在黄体形成中低氧条件的重要性。同样,在小鼠的颗粒细胞中^[51]也证实了在黄体形成过程中, HIF-1 α 刺激 StAR 的同时能增加生成类固醇的能力。此外, Klipper 等^[52]和 Cacioppo 等^[53]研究发现,低氧时 LH 峰形成后也促进 EDN2 的表达,其通过促进黄体细胞的血管生成、增殖和分化诱导黄体形成。这些结果表明,排

卵后由于血液供应不足及血管的破坏导致短暂的低氧环境,激活 HIF 和 VEGF、StAR、EDN2 的活性,促进血管的生成和黄体的形成。

对牛的研究表明,黄体发生退化时,血液浓度也相应的降低,孕酮合成下降^[54]。这些研究结果暗示血流量降低可能与黄体功能退化相关。在黄体退化过程中,血管的封闭发生伴随内皮细胞的退化进入小血管腔,导致了血液供应降低,从而形成低氧环境。然而,血液供应的降低怎样调节黄体退化? Nishimura 等^[2,54]研究表明哺乳动物存在适应低氧条件的细胞机制:低氧降低 P540scc 的活性影响孕酮的合成,从而促进黄体退化。此外,有研究发现低氧能诱导卵巢细胞的凋亡^[55]。这暗示细胞凋亡可能是引起黄体退化的原因之一。Nishimura 等^[56]研究表明低氧条件下, HIF-1 α 诱导 BNIP3 超表达,促进凋亡因子如细胞色素 c 的释放,通过激活 Caspases-3(促进细胞凋亡中半胱天冬酶的活性),引起黄体细胞的凋亡。而在黄体的低氧微环境中,孕酮合成降低刺激 Caspases-3 也导致黄体细胞的凋亡。令人疑惑的是,在低氧中用孕酮进行刺激处理时, BNIP3 的表达并

不会上升,但细胞凋亡的程度和 Capases-3 的活性却可通过孕酮的处理降低,这表明低氧抑制孕酮的产生并不会参与 BNIP3 信号通路诱导黄体细胞的凋亡。总之,低氧诱导黄体细胞的凋亡主要涉及两条信号通路: HIF1 α -BNIP3 和低氧降低孕酮的合成促进 Capases-3(图 3)。

3 结语与展望

本文重点阐述哺乳动物卵巢内低氧及低氧诱导因子参与激素的产生、卵泡的发育、卵泡成熟破裂后排卵以及黄体的形成和退化过程的分子机制。深入研究发现,排卵过程中的各环节均不是由单一因素决定的,而是复杂多变的,尽管调控这一过程的分子网络正在逐渐完善,但仍需要深入探索。低氧除了在正常排卵过程中扮演着重要角色外,其更广为人知的作用是与肿瘤发生的关系——低氧能促进肿瘤细胞转移及其发展,因而众多学者认为 HIF-1 是阻断肿瘤转移途径的潜在靶点^[57]。HIF 既能维持正常的排卵过程又能参与如卵巢癌、子宫内膜癌等^[57]肿瘤的发展,这不禁让人疑惑,低氧及低氧诱导因子如何在卵巢的正常组织与癌组织中发挥作用? 如何在不同细胞的不同时期对机体进行精准调控? 低氧及低氧诱导因子在卵巢中调控的复杂性也提示其在卵巢中的重要性。目前初步探明哺乳动物卵巢内激素水平的紊乱会引起动脉循环的变化,导致血液流动发生改变及卵巢功能的紊乱而引起病变^[58]。但卵巢内的激素变化如何调节低氧分子机制以及二者如何发挥相互作用,目前仍缺乏研究。解决这些问题有助于全面理解哺乳动物排卵过程及相关疾病的发生机理,这将对家畜动物的繁殖力的提高和人类老龄化卵巢功能疾病的治疗产生新的认识。

参考文献(References):

- [1] Breen SM, Andric N, Ping T, Xie F, Offermans S, Gossen JA, Ascoli M. Ovulation involves the luteinizing hormone-dependent activation of Gq/11 in granulosa cells. *Mol Endocrinol*, 2013, 27(9): 1483–1491. [DOI]
- [2] Nishimura R, Okuda K. Multiple roles of hypoxia in ovarian function: roles of hypoxia-inducible factor-related and -unrelated signals during the luteal phase. *Reprod Fertil Dev*, 2015. [DOI]
- [3] Tam KK, Russell DL, Peet DJ, Bracken CP, Rodgers RJ, Thompson JG, Kind KL. Hormonally regulated follicle differentiation and luteinization in the mouse is associated with hypoxia inducible factor activity. *Mol Cell Endocrinol*, 2010, 327(1–2): 47–55. [DOI]
- [4] Hashimoto T, Shibasaki T. Hypoxia-inducible factor as an angiogenic master switch. *Front Pediatr*, 2015, 3: 33. [DOI]
- [5] Takacova M, Pastorekova S. Tumour hypoxia-molecular mechanisms and clinical relevance. *Klin Onkol*, 2015, 28(3): 183–190. [DOI]
- [6] Li QF, Dai AG. Progress of HIFs. *Journal of Medical Molecular Biology (wuhan)*, 2003, 25(4): 219–223. 李启芳, 戴爱国. 低氧诱导因子家族研究进展. 国外医学分子生物学分册, 2003, 25(4): 219–223. [DOI]
- [7] Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*, 1992, 12(12): 5447–5454. [DOI]
- [8] Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y. A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 α regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(9): 4273–4278. [DOI]
- [9] Gu YZ, Moran SM, Hoqenesch JB, Wartman L, Bradfield CA. Molecular characterization and chromosomal localization of a third α -class hypoxia inducible factor subunit, HIF3 α . *Gene Expr*, 1998, 7(3): 205–213. [DOI]
- [10] Pawlus MR, Cheng JH. Enhanceosomes as integrators of hypoxia inducible factor (HIF) and other transcription factors in the hypoxic transcriptional response. *Cell Signal*, 2013, 25(9): 1895–1903. [DOI]
- [11] Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG Jr. HIF1 α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science*, 2001, 292(5516): 464–468. [DOI]
- [12] Ivan M, Kaelin WG Jr. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Curr Opin Genet Dev*, 2001, 11(1): 27–34. [DOI]
- [13] Lisztwan J, Imbert G, Wirbelauer C, Gstaiger M, Krek W. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is a component of an E3 ubiquitin-protein ligase activity. *Genes Dev*, 1999, 13(14): 1822–1833. [DOI]
- [14] Iwai K, Yamanaka K, Kamura T, Minato N, Conaway RC,

- Conaway JW, Klausner RD, Pause A. Identification of the von Hippel-Lindau tumor-suppressor protein as part of an active E3 ubiquitin ligase complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(22): 12436–12441. [DOI]
- [15] Heikkilä M, Pasanen A, Kivirikko KI, Myllyharju J. Roles of the human hypoxia-inducible factor (HIF)-3 α variants in the hypoxia response. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68(23): 3885–3901. [DOI]
- [16] Chen L, Endler A, Shibasaki F. Hypoxia and angiogenesis: regulation of hypoxia-inducible factors via novel binding factors. *Exp Mol Med*, 2009, 41(12): 849–857. [DOI]
- [17] Cockman ME, Masson N, Mole DR, Jaakkola P, Chang GW, Clifford SC, Maher ER, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Maxwell PH. Hypoxia inducible factor- α binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem*, 2000, 275(33): 25733–25741. [DOI]
- [18] Zhao YZ, Liu XL, Shen GM, Ma YN, Zhang FL, Chen MT, Zhao HL, Yu J, Zhang JW. Hypoxia induces peroxisome proliferator-activated receptor γ expression via HIF-1-dependent mechanisms in HepG2 cell line. *Arch Biochem Biophys*, 2014, 543: 40–47. [DOI]
- [19] Pawlus MR, Wang L, Murakami A, Dai G, Hu CJ. STAT3 or USF2 contributes to HIF target gene specificity. *PLoS One*, 2013, 8(8): e72358. [DOI]
- [20] Pawlus MR, Wang L, Hu CJ. STAT3 and HIF1 α cooperatively activate HIF1 target genes in MDA-MB-231 and RCC4 cells. *Oncogene*, 2014, 33(13): 1670–1679. [DOI]
- [21] Pawlus MR, Wang L, Ware K, Hu CJ. Upstream stimulatory factor 2 and hypoxia-inducible factor 2 α (HIF2 α) cooperatively activate HIF2 target genes during hypoxia. *Mol Cell Biol*, 2012, 32(22): 4595–4610. [DOI]
- [22] Cui J, Shen Y, Li R. Estrogen synthesis and signaling pathways during ageing: from periphery to brain. *Trends Mol Med*, 2013, 19(3): 197–209. [DOI]
- [23] Kowalewski MP, Gram A, Boos A. The role of hypoxia and HIF1 α in the regulation of STAR-mediated steroidogenesis in granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol*, 2015, 401: 35–44. [DOI]
- [24] Yu RM, Chu DL, Tan TF, Li VW, Chan AK, Giesy JP, Cheng SH, Wu RS, Kong RY. Leptin-mediated modulation of steroidogenic gene expression in hypoxia-exposed zebrafish embryos: implications for the disruption of sex steroids. *Environ Sci Technol*, 2012, 46(16): 9112–9119. [DOI]
- [25] Fadhill, Yoshioka S, Nishimura R, Okuda K. Hypoxia promotes progesterone synthesis during luteinization in bovine granulosa cells. *J Reprod Dev*, 2014, 60(3): 194–201. [DOI]
- [26] Cui J, Shen Y, Li R. Estrogen synthesis and signaling pathways during ageing: from periphery to brain. *Trends Mol Med*, 2013, 19(3): 197–209. [DOI]
- [27] Shang EH, Yu RM, Wu RS. Hypoxia affects sex differentiation and development, leading to a male-dominated population in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Sci Technol*, 2006, 40(9): 3118–3122. [DOI]
- [28] Iacono E, Merlo B, Rizzato G, Mislei B, Govoni N, Tamani C, Mari G. Effects of repeated transvaginal ultrasound-guided aspirations performed in anestrus and cyclic mares on P4 and E2 plasma levels and luteal function. *Theriogenology*, 2014, 82(2): 225–231. [DOI]
- [29] Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, 2003, 9(6): 669–676. [DOI]
- [30] Alam H, Weck J, Maizels E, Park Y, Ashcroft M, Hunzicker-Dunn M. Role of the phosphatidylinositol-3-kinase and extracellular regulated kinase pathways in the induction of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 activity and the HIF-1 target vascular endothelial growth factor in ovarian granulosa cells in response to follicle-stimulating hormone. *Endocrinology*, 2009, 150(2): 915–928. [DOI]
- [31] Thompson JG, Brown HM, Kind KL, Russell DL. The ovarian antral follicle: Living on the edge of hypoxia or not? *Biol Reprod*, 2015, pii: biolreprod.115.128660. [DOI]
- [32] Redding GP, Bronlund JE, Hart AL. Theoretical investigation into the dissolved oxygen levels in follicular fluid of the developing human follicle using mathematical modeling. *Reprod Fertil Dev*, 2008, 20(3): 408–417. [DOI]
- [33] Zimmermann RC, Hartman T, Kavic S, Pauli SA, Bohlen P, Sauer MV, Kitajewski J. Vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis is essential for gonadotropin-dependent follicle development. *J Clin Invest*, 2003, 112(5): 659–669. [DOI]
- [34] Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(10): 721–732. [DOI]
- [35] Rico C, Dodelet-Devillers A, Paquet M, Tsoi M, Lapointe E, Carmeliet P, Boerboom D. HIF1 activity in granulosa cells is required for FSH-regulated Vegfa expression and follicle survival in mice. *Biol Reprod*, 2014, 90(6): 135. [DOI]
- [36] Meidan R, Klipper E, Zalman Y, Yalu R. The role of hypoxia-induced genes in ovarian angiogenesis. *Reprod Fertil Dev*, 2013, 25(2): 343–350. [DOI]
- [37] Grasselli F, Basini G, Bussolati S, Bianco F. Cobalt chloride, a hypoxia-mimicking agent, modulates redox status and functional parameters of cultured swine granulosa cells. *Reprod Fertil Dev*, 2005, 17: 715–720. [DOI]
- [38] Yacobi K, Tsafiriri A, Gross A. Luteinizing hormone-induced caspase activation in rat preovulatory follicles is coupled to mitochondrial steroidogenesis. *Endocrinology*,

- 2007, 148(4): 1717–1726. [DOI]
- [39] Kim J, Sato M, Li Q, Lydon JP, Demayo FJ, Bagchi IC, Bagchi MK. Peroxisome proliferator-activated receptor is a target of progesterone regulation in the preovulatory follicles and controls ovulation in mice. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(5): 1770–1782. [DOI]
- [40] Kim J, Bagchi IC, Bagchi MK. Control of ovulation in mice by progesterone receptor-regulated gene networks. *Mol Hum Reprod*, 2009, 15(12): 821–828. [DOI]
- [41] Kim J, Bagchi IC, Bagchi MK. Signaling by hypoxia-inducible factors is critical for ovulation in mice. *Endocrinology*, 2009, 150(7): 3392–3400. [DOI]
- [42] Robker RL, Akison LK, Russell DL. Control of oocyte release by progesterone receptor-regulated gene expression. *Nucl Recept Signal*, 2009, 7: e012. [DOI]
- [43] Robker RL, Russell DL, Espey LL, Lydon JP, Malley BW, Richards JS. Progesterone-regulated genes in the ovulation process: ADAMTS-1 and cathepsin L proteases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(9): 4689–4694. [DOI]
- [44] Sriraman V, Eichenlaub-Ritter U, Bartsch JW, Rittger A, Mulders SM, Richards JS. Regulated expression of ADAM8 (a disintegrin and metalloprotease domain 8) in the mouse ovary: evidence for a regulatory role of luteinizing hormone, progesterone receptor, and epidermal growth factor-like growth factors. *Biol Reprod*, 2008, 78(6): 1038–1048. [DOI]
- [45] Kang YH, Zhang BY, Wang PQ, Chu MX, Lai P, Cai BJ, Song WJ. Progesterone receptor-mediated molecular mechanisms on mam-malian female reproduction. *Hereditas (Beijing)*, 2012, 34(10): 1223–1232.
- 康岳华, 张宝云, 王凭青, 储明星, 赖平, 蔡冰杰, 宋文静. 孕酮受体介导哺乳动物雌性生殖活动的分子机理. *遗传*, 2012, 34(10): 1223–1232. [DOI]
- [46] Shkolnik K, Tadmor A, Ben-Dor S, Nevo N, Galiani D, Dekel N. Reactive oxygen species are indispensable in ovulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(4): 1462–1467. [DOI]
- [47] Yalu R, Oyesiji AE, Eisenberg I, A, Imbar T, Meidan R. HIF1A-dependent increase in endothelin 2 levels in granulosa cells: role of hypoxia, LH/cAMP, and reactive oxygen species. *Reproduction*, 2015, 149(1): 11–20. [DOI]
- [48] Reynolds LP, Killilea SD, Redmer DA. Angiogenesis the female reproductive system. *Faseb J*, 1992, 6(3): 886–892. [DOI]
- [49] Fadhillah, Yoshioka S, Nishimura R, Okuda K. Hypoxia promotes progesterone synthesis during luteinization in bovine granulosa cells. *J Reprod Dev*, 2014, 60(3): 194–201. [DOI]
- [50] Li D, Redding GP, Bronlund JE. Oxygen consumption by bovine granulosa cells with prediction of oxygen transport in preantral follicles. *Reprod Fertil Dev*, 2013, 25(8): 1158–1164. [DOI]
- [51] Kowalewski MP, Gram A, Boos A. The role of hypoxia and HIF1 α in the regulation of STAR-mediated steroidogenesis in granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol*, 2015, 401: 35–44. [DOI]
- [52] Klipper E, Levit A, Mastich Y, Berisha B, Schams D, Meidan R. Induction of endothelin-2 expression by luteinizing hormone and hypoxia: possible role in corpus luteum formation. *Endocrinology*, 2010, 151(4): 1914–1922. [DOI]
- [53] Cacioppo JA, Oh SW, Kim HY, Cho J, Lin PC, Yanagisawa M, Ko C. Loss of function of endothelin-2 leads to reduce ovulation and CL formation. *PLoS One*, 2014, 9(4): e96115. [DOI]
- [54] Nishimura R, Sakumoto R, Tatsukawa Y, Acosta TJ, Okuda K. Oxygen concentration is an important factor for modulating progesterone synthesis in bovine corpus luteum. *Endocrinology*, 2006, 147(9): 4273–4280. [DOI]
- [55] Matsushita H, Morishita R, Nata T, Aoki M, Nakagami H, Taniyama Y, Yamamoto K, Higaki J, Yasufumi K, Ogihara T. Hypoxia-induced endothelial apoptosis through nuclear factor-kappaB (NF-kappaB)-mediated bcl-2 suppression: *in vivo* evidence of the importance of NF-kappaB in endothelial cell regulation. *Circ Res*, 2000, 86(9): 974–981. [DOI]
- [56] Nishimura R, Komiyama J, Tasaki Y, Acosta TJ, Okuda K. Hypoxia promotes luteal cell death in bovine corpus luteum. *Biol Reprod*, 2008, 78(3): 529–536. [DOI]
- [57] Zhao CY, Zhang X, Du LR. Progress of hypoxia-1 in gynecotokology. *Chinese Journal of Family Planning & Gynecotokology*, 2014, 6(2): 14–17. [DOI]
- 赵彩艳, 张欣, 杜丽荣. 低氧诱导因子-1 在妇产科领域的研究进展. *中国计划生育和妇产科*, 2014, 6(2): 14–17.
- [58] Papler TB, Bokal EV, Tacer KF, Juvan P, Virant Klun I, Devjak R. Differences in cumulus cells gene expression between modified natural and stimulated in vitro fertilization cycles. *J Assist Reprod Genet*, 2014, 31(1): 79–88. [DOI]