

间隙连接蛋白在卵泡发育过程中的作用 *

侯建华^{1,2} 岑尧^{2△} 马玉珍²

(1 内蒙古医学院 内蒙古 呼和浩特 010050 2 内蒙古自治区人民医院 内蒙古 呼和浩特 010017)

摘要 间隙连接广泛分布于各种组织细胞中,由其构成的通道允许小分子信号物质在相邻细胞间直接传递,在细胞间的通讯方面起着非常重要的作用。间隙连接由连接蛋白(Cx)组成,目前已经发现 Cx 家族有 20 多个成员^[1],它们在相邻细胞间组成同种或异种间隙连接,调控着细胞的增殖和分化。在哺乳动物卵泡发育过程中,卵母细胞与周围的颗粒细胞之间形成的缝隙连接,介导胞间通讯,对生殖细胞迁移、卵母细胞减数分裂能力恢复、颗粒细胞分层、卵泡成腔、黄体形成、促性腺激素信号传递有非常重要的调节作用。本文根据近年来相关的研究报道,对卵泡发育过程中间隙连接的作用进行综述。

关键词 卵泡发育;间隙连接通讯;间隙连接蛋白

中图分类号 R711.6 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2012)09-1791-03

Role of the Connexins in the Ovarian Follicle Development*

HOU Jian-hua¹, CEN Yao^{2△}, MA Yu-zhen²

(1 Inner Mongolia Medical College, Inner Mongolia, Hohhot, 010050, China;

2 Inner Mongolia Autonomous Region People's Hospital, Inner Mongolia, Hohhot, 010017, China)

ABSTRACT: Gap junctional intercellular channels are widely distributed in various tissues and cells, which allow adjacent cells to share small molecules directly, playing an important role in cellular communication. Gap junctional intercellular channels are composed of connexins, a homologous family of more than twenty proteins have been characterized^[1]. Gap junctional intercellular channels regulate the cell proliferation and cell differentiation. Oocytes and granulosa cells regulate follicle development by cellular communication via gap junctional intercellular channels. In follicle development, the function of gap junctions regulates primordial germ cell migration, oocytes meiotic competence recovery, granulosa multilaminar, follicle antrum formation, corpora lutea formation, signal transduction of gonadotropins. This review summarizes evidence of recent experiments to illustrate the possible functions of different gap junctions in the follicle development.

Key words: Follicle development; Gap junctional communication; Connexin

Chinese Library Classification: R711.6 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)09-1791-03

前言

哺乳动物体内细胞之间以间接与直接通讯进行物质和信息的交流,而作为细胞间直接通讯的一种重要方式,间隙连接在整个卵泡形成发育过程中都起着非常重要的作用。本文就几种与卵泡的发生、发育相关的间隙连接蛋白的最新研究做一简单概述。

1 卵泡的发育过程

在卵泡发生过程中,处于第一次减数分裂期的卵原细胞与从性索分化而来的卵巢前体颗粒细胞形成原始卵泡。随着卵泡发育,卵子的成熟与卵泡体细胞间的相互作用越来越多地受到卵巢内外信号的影响。卵泡中的卵母细胞被不断增厚的颗粒细胞层所包围,颗粒细胞外又被基膜,而包围基膜的膜细胞是卵泡中唯一可以与卵巢内的毛细血管接触的结构。卵丘细胞形成的突出物可以穿过透明带与卵母细胞表面的突起接触,形

成缝隙连接。有证据表明,这种细胞通讯方式在卵泡中的各种细胞间(颗粒细胞-颗粒细胞、卵母细胞-颗粒细胞、膜细胞-颗粒细胞)广泛存在。卵母细胞生长所需物质及调控信号都要通过卵母细胞与颗粒细胞间构成的细胞通讯以及颗粒细胞与膜细胞之间的细胞通讯来实现。随着分子生物学以及相关实验技术的发展,从分子水平揭示间隙连接在卵泡发育过程的作用已经成为可能。哺乳动物中,卵泡发育与间隙连接通讯方面的研究也较为深入,本文主要对卵泡发育过程中间隙连接的作用进行论述。

2 间隙连接细胞间通讯概述

哺乳动物细胞之间通常以直接或间接通讯的方式进行物质交换和信息交流。直接通讯以细胞间隙连接为途径进行的细胞间直接的信息和物质流通,又称间隙连接细胞间通讯(Gap junction intercellular communication, GJIC)。细胞间隙连接通道是目前已知的细胞间进行直接通讯的唯一的膜通道结构,相邻

* 基金项目 国家自然科学基金项目 (30460088)

作者简介 侯建华(1980-),女,硕士,检验技师,主要研究方向:生殖医学,电话:15848145018, E-mail:31537629@qq.com

△通讯作者 岑尧, E-mail: cenyao_2006@126.com

(收稿日期:2011-11-20 接受日期:2011-12-14)

细胞间通过这一通道进行物质、信息和能量的交换,参与代谢偶联和电偶联,对调节细胞新陈代谢、内环境稳定、增殖和分化等生理过程起着重要的作用^[23]。GJIC 组成的结构单位是间隙连接蛋白(Connexin,Cx),每个 GJIC 包括 2 个分布在相邻细胞膜中的半通道(connexons),每个半通道由 6 个 Cx 蛋白分子组成,在该六聚体中,Cx 亚基环绕排列成直径约 1.5nm 的水性通道,允许细胞内的离子和小分子物质在相邻细胞间进行传递^[4]。Cx 基因是一个多基因家族,从 1986 年克隆得到第一个 Cx 基因,到目前为止,在哺乳动物中已发现 22 个成员^[1]。cDNA 克隆分析显示该基因家族各成员之间具有高度的同源性,基因结构也相对保守。而间接通讯是指以体循环远程分泌、旁分泌或自分泌等方式经第二信使完成一系列的生理、生化功能的调节方式,是不同组织细胞间进行物质及能量转换的重要途径。

哺乳动物卵泡是由卵母细胞、颗粒细胞和卵泡基膜组成的。基膜包围在颗粒细胞外,是卵泡与卵巢进行直接的信息和物质交流的重要结构,调控卵母细胞发育的各种信号都是通过卵母细胞与颗粒细胞、颗粒细胞与膜细胞之间的细胞通讯结构进行传递的^[5]。因此,卵母细胞与颗粒细胞、颗粒细胞与颗粒细胞以及颗粒细胞与膜细胞之间的缝隙连接所介导的细胞间通讯在卵泡细胞间信息沟通与物质交换中起重要的作用。

在卵泡发育的不同阶段,Cx 的表达及功能具有阶段特异性。啮齿类动物卵巢中,间隙连接在卵泡形成早期就已存在,直到排卵的数小时后才消失^[6]。Cx 蛋白在原始卵泡中几乎不表达,初级卵泡中偶尔表达,而在各发育阶段的次级卵泡中呈普遍表达。由此可以看出,随着卵泡发育,连接蛋白的表达也增加。这可能是由于在卵泡的生长过程中,卵母细胞与卵泡膜细胞间的颗粒细胞层数增加,卵母细胞与卵巢间的距离增大,可能出现血供不足的情况,因而要求有更加高效的细胞间联系促进卵母细胞成熟所需的物质和能量供给。通过 RNA 印迹、原位杂交、RT-PCR 和免疫组织化学等实验证实,哺乳动物卵巢组织内存在多种连接蛋白,卵母细胞和颗粒细胞主要表达 Cx43、Cx37、Cx26、Cx32、Cx57,而膜细胞间主要表达 Cx26 和 Cx32,闭锁卵泡中有连接蛋白表达但表达较少。

3 几种间隙连接蛋白在卵泡表达及发育过程中的作用

3.1 Cx26 和 Cx32 在卵泡表达及发育过程中的作用

有研究证明,间隙连接蛋白 Cx26 在绵羊和牛卵母细胞中及猪卵泡膜细胞上都有表达^[7-9]。2001 年,Wright^[10]等通过在小鼠中的研究发现,Cx26 和 Cx32 存在于小鼠卵母细胞和卵泡膜细胞中。但是,G. M. Kidder 采用 RT-PCR 的方法却无法在裸鼠卵母细胞和幼鼠卵巢中检测到 CX26 的 mRNA,Risek^[11]等在成年大鼠卵巢组织的 Northern 杂交实验中也未发现 Cx26 的表达^[12]。另外有实验表明,Cx32 在卵泡发育过程中的作用可能并不是最为重要的,因为敲除该基因的小鼠仍具有生殖繁育的能力。

3.2 Cx37 在卵泡表达及发育过程中的作用

Cx37 作为哺乳动物卵泡中主要的间隙连接蛋白之一,一直是国内外相关研究的热点。Cx37 出现在原始卵泡初期,随着卵泡的发育表达量逐渐增加,至腔体形成时达到峰值,之后表达开始下降。Cx37 曾被认为可能是卵母细胞分泌的唯一一种

功能性间隙连接蛋白,特异表达于卵母细胞^[13],但有报道^[10,14]称在颗粒细胞上也检测到 Cx37 的表达。

Carabasatos 等^[15]发现,体内卵泡发育 3 周时可能有另外一种间隙连接蛋白代替了颗粒细胞内的 Cx37 与卵母细胞建立直接通讯,并且有腔卵泡的颗粒细胞是否纳入了其它连接蛋白构成间隙连接还不确定^[16]。与之结论相似的是,Veitch 等^[14]研究表明在卵泡长期的体内发育过程中,Cx37 表达的缺失并没有影响卵泡的发生,Cx37 敲除野生型小鼠卵巢中,颗粒细胞能够支持卵泡发育成熟,而受精后在胚胎发育过程中又有多种间隙连接蛋白表达,形成丰富的间隙连接通讯促进信号物质等在细胞间的传递,从而维持胚胎正常发育。

3.3 Cx43 在卵泡表达及发育过程中的作用

Cx43 是卵巢组织中表达最为丰富的间隙连接蛋白,存在于各种卵泡细胞中。Cx43 最早出现在原生殖细胞(PGCs)刚开始向生殖嵴迁移的时候,可在第 11.5 天小鼠胚胎的未分化的性腺细胞中检测到其表达,之后随着胚胎发育的进程 Cx43 逐渐出现在体细胞和配子中。从原始卵泡开始,Cx43 存在于各时期卵泡的颗粒细胞中,表达量随着卵泡的发育逐渐增多,尤其在有腔卵泡阶段增长最快。

Cx43 缺失小鼠的卵巢内,多数卵泡在颗粒细胞分层之前就已停止发育。卵泡结构出现异常,例如透明带发育不足、卵母细胞和颗粒细胞空泡化以及卵母细胞因减数分裂恢复受到抑制而不具备受精能力^[17-18]。导致上述异常的主要原因可能是 Cx43 缺失导致颗粒细胞间通讯消失,继而导致颗粒细胞增殖和扩展失败。由此看来,Cx43 对于保证颗粒细胞的正常增殖和分层,维持卵泡正常结构和功能至关重要。

3.4 Cx57 在卵泡表达及发育过程中的作用

现有的研究结果显示,Cx57 的表达定位于小鼠发育成熟的卵巢组织中,推测其在卵泡发生中具有一定的作用。Cx57 与 Cx60 同源,Cx60 是从猪卵巢中通过 cDNA 克隆得到的一种间隙连接蛋白基因,主要在颗粒细胞及卵泡膜细胞中表达。虽然目前还没有获得 Cx57 蛋白的抗体,但 RT-PCR 结果已经证明,在出生第 2 天的小鼠卵巢中存在编码该蛋白的 mRNA,主要通过卵巢组织中表达参与早期卵泡的发生。

综上所述,在小鼠中,间隙连接蛋白 Cx32、Cx37、Cx43 和 Cx57 是通过在不同发育阶段以及成熟卵泡中的表达来参与调控卵泡发生的。

4 展望

目前对于间隙连接的研究非常广泛,愈来愈多的研究发现,间隙连接不仅起到物质运输通道的作用,还涉及细胞间多种信号的传递和能量的转换。Cx26、Cx32、Cx37、Cx43、Cx57 等几种连接蛋白的表达和作用不仅仅局限在颗粒细胞及卵母细胞中,对卵母细胞发育及受精过程起调控作用,同时还在其它细胞中表达并发挥着重要功能。Cx 在卵泡发育过程中功能的差异性主要是由于不同的 Cx 所形成的细胞间通道对通过的信号分子进行了特异性的选择,但是目前对其作用机制及表达调控机理还了解不够。随着分子生物学以及相关实验技术的发展,以及对间隙连接蛋白家族中的其他成员的研究,GJIC 在卵泡发育中的功能和作用机制将逐渐被了解,相关研究也会为进

一步了解卵子的发育、受精、胚胎着床及不孕症的治疗等提供新的思路。

参考文献(References)

- [1] Yan Zhen, Ma Yuzhen, et al. Target suppression of connexin43 in ovine reimplantation embryos by RNA interference using double-stranded RNA [J]. Asian-australasian journal of animal sciences, 2010, 23 (4): 456-464
- [2] 马向东, 隋延仿, 王文亮, 等. 间隙连接 Cx32 mRNA、Cx43 mRNA 及其蛋白产物在肝细胞、肝癌中的表达[J]. 临床与实验病理学杂志. 1999, 15(1): 32-34
Ma Xiang-dong, Sui Yan-fang, Wang Wen-liang, et al. Cx32 mRNA, Cx43 mRNA and their proteins in human hepatocellular carcinoma (HCC) tissues and cell lines [J]. Chinese journal of clinical and experimental pathology, 1999, 15(1): 32-34
- [3] Holder JW, Elmope E, Barrent JC. Gap junction function and cancer [J]. Cancer Res, 1993, 53: 3475-3485
- [4] Contreras JE, Sá ez JC, Bukauskas FF, et al. Gating and regulation of connexin 43 (Cx43) hemichannels [J]. Proc Natl Acad Sci, 2003, 100 (20): 11388-11393
- [5] Matzuk M M, Burns K H, Viveiros M M, Eppig J J. Intercellular communication in the mammalian ovary: Oocytes carry the conversation [J]. Science, 2002, 296: 2178-2180
- [6] Simon A M, Chen H, Jackson C L. Cx37 and Cx43 localize to zona pellucida in mouse ovarian follicles [J]. Cell Commun Adhes, 2006, 13 (122): 261-277
- [7] Itahana K, Morikazu Y and Takeya T. Differential expression of four connexin genes, Cx-26, Cx-303, Cx32, and Cx43, in the porcine ovarian follicle [J]. Endocrinology, 1996, 137: 5036-5044
- [8] Grazul-Bilska AT, Redmer DA, Bilski JJ, Jablonka-Shariff A, Doraiswamy V and Reynolds LP. Gap junctional proteins, connexin 26, 32, and 43 in sheep ovaries throughout the estrous cycle [J]. Endocrine, 1998, 8: 269-279
- [9] Johnson ML, Redmer DA, Reynolds LP and Grazul-Bilska AT (1999) Expression of gap junctional proteins connexin 43, 32, and 26 through-out follicular development and atresia in cows [J]. Endocrine, 1999, 10 : 43-51
- [10] Wright CS, Becker DL, Lin JS, Warner AE and Hardy K. Stage-specific and differential expression of gap junctions in the mouse ovary: connexin-specific roles in follicular regulation [J]. Reproduction, 2001, 121: 77-88
- [11] Risek B, Guthrie S, Kumar NM and Gilula NB. Modulation of gap junction transcript and protein expression during pregnancy in the rat [J]. Journal of Cell Biology, 1990, 110: 269-282
- [12] Nelles E, Bützler C, Jung D, et al. Defective propagation of signals generated by sympathetic nerve stimulation in the liver of connexin32-deficient mice [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 1996, 93: 9565-9570
- [13] Teilmann S C. Differential expression and localization of connexin37 and connexin43 in follicles of different stages in the 4 week old mouse ovary [J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2005, 234: 27-35
- [14] Veitch, G. I., Gittens, J. E., Shao, Q., Laird, D. W. and Kidder, G. M. Selective assembly of connexin37 into heterocellular gap junctions at the oocyte/granulosa cell interface [J]. J. Cell Sci, 2004, 117: 2699-2707
- [15] Carabatsos, M. J., Sellitto, C., Goodenough, D. A. and Albertini, D. F. Oocyte-granulosa cell heterologous gap junctions are required for the coordination of nuclear and cytoplasmic meiotic competence [J]. Dev. Biol, 2000, 226: 167-179
- [16] Kidder, G. M. and Mhawji, A. A. Gap junctions and ovarian folliculogenesis [J]. Reproduction, 2002, 123: 613-620
- [17] Ackert, C. L., Gittens, J. E., O'Brien, M. J., Eppig, J. J. and Kidder, G. M. Intercellular communication via connexin43 gap junctions is required for ovarian folliculogenesis in the mouse [J]. Dev. Biol, 2001, 233: 258-270
- [18] Juneja, S. C., Barr, K. J., Enders, G. C. and Kidder, G. M. Defects in the germ line and gonads of mice lacking connexin43 [J]. Biol. Reprod, 1999, 60: 1263-1270