

基质金属蛋白酶系统与卵巢功能调节

刘冬林 祝 诚*

(中国科学院动物研究所计划生育生殖生物学国家重点实验室, 北京 100080. *联系人, E-mail: zhuc@panda.ioz.ac.cn)

哺乳动物的大多数器官在形成后, 极少出现周期性的组织重建. 然而, 雌性动物的生殖系统, 包括子宫内膜、乳腺、卵巢卵泡和黄体等在生殖周期或生命过程中的不同阶段经历着生长、成熟和萎缩等周期性变化. 这些动态组织的变更要求细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的不断重建. ECM 成分包含蛋白和非蛋白分子, 它们形成具有组织特异性的细胞黏附结构. 其中基质蛋白与其细胞受体的相互作用能调节细胞结构、第二信使的产生和基因表达. ECM 内环境稳定性的维持在很大程度上依赖于基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)及其组织抑制因子(tissue inhibitors of MMPs, TIMPs)的协调控制, MMPs-TIMPs 是参与 ECM 降解和重建的主要蛋白酶系统^[1]. 在雌性动物中, MMPs-TIMPs 通过调节卵巢动态结构成分的周期性变化, 对卵泡和黄体功能发挥极为重要的作用. 近年来, 该方面的研究和报道日益增多, 本文着重介绍 MMPs-TIMPs 对卵巢中卵泡生长、闭锁、排卵、黄体形成和萎缩等功能的调节及其主要研究进展.

1 MMPs 与 TIMPs

(i) MMPs. MMPs 是一类以 ECM 组分为主要底物的锌蛋白酶, 包括最新克隆的 MMP-28, 共发现 25 个成员^[1,2], 分属于胶原酶(collagenase)、明胶酶(gelatinase)、溶基质素(stromelysin)、膜型 MMPs (membrane type MMPs, MT-MMPs)和其他 MMPs 等 5 大类. 近年的研究发现, MMPs 不仅在有机体生长发育中的 ECM 更新(turnover)和重塑(remodelling)以及疾病的病理损害过程中起很重要的作用, 它们还可能通过降解 IL-1 β , TNF- α , IGFBP, FGF 和血管紧张素(angiotensin)等分子参与细胞功能调节和信号转导^[1].

(ii) TIMPs. TIMPs 广泛存在于各类组织中, 对大多数 MMPs 成员具有特异性抑制作用. 但近来发现, TIMP-2 可与 MMP-2 前体形成非抑制性复合物, 帮助 MMP-2 的激活^[1]. 除对 MMPs 的活性具有调节作用外, 越来越多的证据表明^[1], TIMPs 可作为自分泌或旁分泌因子, 参与细胞增殖、分化和血管新生等

生理过程, 在卵巢中还可刺激类固醇激素的合成^[3].

2 MMPs-TIMPs 对卵泡生长和闭锁的调节

(i) 卵泡生长. 卵泡生长经历从原始卵泡向排卵前卵泡的发育过程, 包括原始卵泡的启动、膜层与颗粒细胞层的分化、血管生成、卵泡窦出现、卵丘扩展以及卵泡周围基质的重塑等细胞和组织变化. MMPs-TIMPs 参与这些变化过程中 ECM 重建和卵泡细胞的生长分化.

Bagavandoss 等人^[3,4]观察到大鼠卵巢中明胶酶 MMP-2, -9 的 mRNA 和蛋白表达及酶活性随卵泡发育而增强, 并受毛绒膜促性腺激素(eCG)和孕马血清促性腺激素(PMSG)等的调节, 其定位和表达模式与卵泡发育时的组织结构分化一致. 而胶原酶 MMP-13 主要定位于窦状卵泡的膜细胞和间质细胞^[5], 且在动情前期有较高的表达, 可能参与排卵前卵泡的形成过程.

最新研究表明^[3], MMPs 不仅通过降解 ECM 成分参与卵泡发育时的卵巢组织重建, 它们还可降解 IL-1 β , TNF- α , FGF 和 IGFBP 等分子, 通过调节细胞因子或生长因子的活性, 促进卵巢中卵泡的协调生长和优势卵泡的选择.

卵泡的早期生长中, TIMPs 的作用较少引起人们的注意. 近年越来越多的研究发现^[3], 卵泡发育时, TIMPs 产生于卵泡膜、基质、间质组织和生发上皮中, 其变化与 MMPs 的改变呈平行关系, 通过与 MMPs 的精密协调, 调节卵泡组织重建的部位和程度. 另外, 在卵泡形成时 TIMPs 还可作为自分泌/旁分泌因子, 调节细胞增殖、分化、血管新生和激素合成.

(ii) 卵泡闭锁. 某些 MMPs 活性的升高可导致卵泡闭锁. 在去垂体后的绵羊闭锁卵泡的卵泡液中, 明胶酶 A 和 B 的活性明显升高^[6], 可能有利于卵泡闭锁晚期阶段基膜的降解. 但也有资料表明^[7], 卵泡闭锁与卵泡顶部 MMP-1 活性的降低有关, 可能有利于卵泡闭锁时 TNF- α 等细胞因子对细胞凋亡的诱导.

综上所述, 卵泡发育中, MMPs-TIMPs 系统通过参与卵泡成熟和闭锁的调节, 控制物种月经或动情

周期中的正常排卵卵泡数量。

3 MMPs-TIMPs 与排卵

排卵是一个成熟的卵子突破卵泡壁顶部释放的过程。卵泡壁顶部由单层上皮细胞和两层胶原组成,排卵前卵泡壁顶部胶原的降解被认为是排卵过程的限速步骤。研究发现^[8],纤溶酶原激活因子(PAs)-纤溶酶(plasmin)家族的酶不能独自完成排卵前的蛋白水解,它们不能降解ECM的胶原成分,其在排卵前的主要作用是帮助激活间质胶原酶(MMP-1)。MMPs则是参与卵泡破裂的关键蛋白酶。有实验显示,人工合成的MMPs抑制剂可阻碍排卵过程^[3]。

(i) 胶原酶。胶原酶包括间质胶原酶和胶原酶-3(即MMP-13),在排卵前卵泡顶部胶原三股螺旋纤维的解旋和降解中起主要作用^[1]。排卵剂量的人绒毛膜促性腺激素(hCG)可诱导恒河猴卵泡中间质胶原酶mRNA表达显著升高^[9]。这种酶存在于卵泡颗粒细胞和膜细胞中,卵泡破裂前其活性明显增加。胶原酶-3在动情期大鼠窦状卵泡膜细胞和基质细胞表达较高^[3],但其活性是否受排卵前促性腺素峰的调节有待证明。

(ii) 明胶酶。明胶酶能裂解变性的胶原(明胶)和IV型胶原(基膜的主要成分),推测在排卵过程中,这类酶对基膜的降解和变性胶原的进一步水解起关键作用。

(1) 明胶酶A(MMP-2)。促黄体激素(LH)峰出现后的大鼠卵巢中明胶酶A的mRNA水平和酶活性显著升高。用 α -N抑制素43 ku亚单位的N末端多肽免疫雌羊可导致卵泡液中明胶酶A浓度下降和排卵受阻。提示该酶在排卵过程中可能发挥着重要作用^[10]。

(2) 明胶酶B(MMP-9)。明胶酶B在排卵过程中的作用尚不清楚。同明胶酶A一样,它能裂解IV型胶原,可能在基膜降解中起作用。在大鼠中^[10],对排卵有刺激作用的IL-1 β 能导致卵泡膜间质细胞的明胶酶B活性增加。然而,正常排卵前的大鼠卵巢中明胶酶B的活性极低。

明胶酶作为降解ECM成分的主要蛋白酶,被认为是排卵过程中重要的调节因子。然而,明胶酶A或B基因敲除的小鼠均不影响生育^[10],它们在排卵过程中是否具有相互替代的作用,仍需进一步研究。

(iii) MT-MMPs。近来发现,MT-MMPs(膜型MMPs)也参与排卵过程的调节,用排卵剂量的hCG

处理未成年大鼠(23 d)后^[11],排卵前卵泡周围的膜间质细胞中MT1-MMP与MMP-2一同表现上调,而其颗粒细胞层中MT1-MMP的表达则下降,这种表达机制和分布说明MT1-MMP在卵泡中可能具有双重功能。开始MT1-MMP在卵泡发育过程中参与降解卵泡内的基质,而在排卵前,则可作为MMP-2前体的激活因子。MT1-MMP能水解I型和III型胶原、纤黏连蛋白、层黏连蛋白和蛋白多糖^[1],因而也可能参与排卵时ECM的降解。

(iv) 溶基质素。这类蛋白酶的某些成员可能参与排卵过程,但目前尚无直接证据。有实验发现^[12],在排卵中起重要作用的缓激肽(bradykinin)能显著诱导卵泡颗粒细胞中溶基质素-1(MMP-3)和Enamelysin(MMP-20)的基因表达,这两种蛋白酶能降解胶原、纤黏连蛋白、层黏连蛋白和明胶等底物,它们是否参与排卵时卵泡壁的破裂过程,有待证实。

(v) TIMPs。TIMPs是细胞外基质中MMPs活性的主要调控因子,它们在排卵过程中的重要作用是控制排卵时ECM的降解程度和维持整个卵巢内环境的稳定。排卵前LH峰可刺激雌羊卵泡中TIMP-1 mRNA和蛋白水平的升高^[8],在排卵前卵泡的颗粒细胞层中有较强的活性。相比之下,TIMP-2在卵泡中呈组成性(constitutive)表达,主要定位在膜细胞层。这种时空表达差异表明TIMP-1、-2在排卵中发挥不同的作用:TIMP-1可能主要调节排卵时蛋白水解的程度,TIMP-2可能通过使明胶酶A和MT1-MMP定位于细胞表面增加水解活性。

4 MMPs-TIMPs 对黄体发育和萎缩的调节

在月经周期和妊娠的不同阶段,黄体经历发育和萎缩的周期性变化。目前,对调节这一变化过程的分子机制仍不完全清楚。许多研究表明,活性形式的MMPs与TIMPs的适当比值对维持黄体细胞所依赖的ECM微环境极为重要,该比值的改变或异常可能影响与ECM相关的细胞信号通路,导致黄体发育和萎缩的周期性变化或结构和功能的异常^[10]。

(i) 黄体形成。黄体的形成过程,即排卵后的卵泡向黄体的转化过程,包含许多细胞和组织变化。我室在研究恒河猴黄体形成时发现^[13],妊娠时MMP-2、-9的mRNA水平显著降低,TIMP-2的基因表达则随妊娠时间的延长呈逐渐增强趋势,它们可能通过其协同表达共同参与妊娠早期黄体的形成。相

比之下, TIMP-1 mRNA 持续表达于恒河猴月经周期及妊娠早期的黄体中, 可能发挥着抑制 MMPs 以外的其他功能. 在大鼠卵巢中^[14], 使用 hCG 诱导排卵后, MMP-2 在新形成的黄体组织中表达显著升高, MMP-9 仅存在于黄体周围的基质中, 并保持相对恒定的水平. TIMP-1, -3 在颗粒细胞开始向黄体细胞转化时即有较强的表达, 而 TIMP-2 的表达出现相对较晚. 这些结果显示, MMPs 与 TIMPs 可能通过其成员间的协调表达共同参与黄体的形成过程, 并且这种调控机制在物种间存在差异.

(1) 细胞分化. 黄体细胞来自于排卵后的卵泡颗粒细胞. 有人^[10]发现, FN, LN 和整合素等 ECM 成分能促进大鼠卵巢颗粒细胞向黄体细胞分化. MMPs 和 TIMPs 则通过调整 ECM 成分参与细胞分化过程. TIMP-1 大量存在于围排卵期和黄体形成期的卵巢中, 其抑制活性不仅表现为对排卵的调节, 还与黄体形成时细胞分化密切相关.

(2) 细胞增殖/迁移. 黄体的发育除由卵泡细胞向黄体细胞转化外, 组织形态和结构改变非常明显, 包括多种细胞增殖和细胞迁移. 其中内皮细胞是主要的增殖和迁移细胞. TIMP-1, -2 可作为生长促进因子, 刺激成纤维细胞和内皮细胞等几种细胞的增殖. 目前, 关于 TIMPs 对细胞生长刺激的机制仍不清楚, 可能有细胞膜受体的参与^[10]. MMPs 除参与细胞迁移时 ECM 重建外, 也可能通过调节细胞因子或生长因子的活性影响细胞增殖^[3].

(3) 血管生成. 排卵后, 包含颗粒细胞层(无血管)的卵泡转变成血管丰富的黄体组织. MMPs 参与黄体血管生成过程的两个极为重要事件——基膜胶原的裂解和内皮细胞的迁移. 最新研究发现^[15], 纤维胶原的特异性裂解是 VEGF 和 bFGF 等生长因子刺激血管发生过程中的限速步骤, MMP-2, -13, -16 和最近克隆的类似于 MMP-9 的明胶酶均存在于血管新生组织中. 在血管形成过程中, 使用抗 MMPs 水解的变异胶原或 MMPs 活性的抑制因子均可影响内皮细胞的迁移, 抑制血管新生. TIMP-1 在黄体形成时仍有较高的表达, 可能对血管内皮细胞的增殖有刺激作用^[3].

(ii) 黄体萎缩. 黄体的维持依赖于 ECM 对黄体细胞结构和功能的保持. 黄体组织能持续产生 TIMP-1, -2 和 -3 等抑制因子, 抑制 MMPs 对 ECM 的降解, 从而使黄体的结构和功能保持稳定^[8]. 黄体萎

缩时, ECM 的完整性受到破坏, 黄体细胞丧失对胞外基质的黏附力和孕酮合成能力, 并出现凋亡^[10].

在用促性腺激素释放激素(GnRH)诱导大鼠黄体溶解时, MMP-2 和 MT1-MMP 的表达显著增加, 它们共同参与黄体溶解时胞外基质的重建^[16]. 在培养条件下, 用溶黄体因子前列腺素 $F_{2\alpha}$ (PGF_{2 α})或肿瘤坏死因子- α (TNF- α)处理黄体细胞也可导致 MMPs 的释放显著升高^[10]. 而 hCG 则可能抑制 MMPs 的表达使人的早孕黄体功能延长——黄体挽救(luteal rescue)^[17].

5 MMPs-TIMPs 与卵巢疾病

MMPs-TIMPs 是卵巢功能极其重要的调节系统. 正常卵巢功能的维持在很大程度上依赖于 MMPs 和 TIMPs 间的协调, 二者的不平衡可导致卵巢疾病的发生.

(i) 卵巢癌. 卵巢癌是妇产科的致死性疾病, 绝大多数起源于卵巢生发上皮^[1], 具有高度浸润性. 研究发现, 卵巢癌中 MMP-2 和 -9 的蛋白表达上调^[8], 其恶性化程度与 MMP-9/MMP-2 的比值及活性形式的 MMPs 浓度有较强的相关性, 而与 TIMP-1/MMP-9 和 TIMP-2/MMP-2 的比值则呈相反相关性^[18]. 此外, MMP-7 在黏液性卵巢瘤(mucinous ovarian tumor)中有较强表达, 并随肿瘤细胞黏蛋白的产生而分泌, 可能与肿瘤侵入和恶性生长有关, 可作为疾病早期的诊断指标或通过抑制 MMP-7 的活性阻止肿瘤浸润^[19].

(ii) 多囊卵巢综合征. 多囊卵巢综合征是导致女性不育的重要原因之一. 主要表现为卵泡大量闭锁、卵巢囊肿和由此引起的高流产率. 目前, 诱发该病的原因仍不完全清楚. 最新研究结果表明^[20], 多囊卵巢综合征的发病涉及到 MMPs-TIMPs 平衡关系的破坏和卵泡中胶原等 ECM 成分的异常降解. 该种疾病妇女卵巢卵泡液中 MMP-2 和 MMP-9 的酶活性明显高于正常组, 而 TIMP-1 的活性则表现相反的结果.

MMPs-TIMPs 参与卵巢功能多方面的调控, 对卵巢正常生理状态的维持有着极其重要的作用. 在由卵巢疾病引起的卵泡发育异常、排卵受阻和黄体不全等功能障碍中, MMPs-TIMPs 的表达模式及其与疾病的相关性仍有待深入研究.

6 结语

卵巢是雌性哺乳动物的动态器官. ECM 通过调节细胞的增殖、分化和功能, 在卵泡发育、闭锁、排

卵以及黄体的形成、维持与萎缩中起非常重要的作用。MMPs 和 TIMPs 通过参与特异性 ECM 成分的降解和重建调节卵巢功能, 这一发现对阐明卵巢功能的调控机理有着极其重要的意义。目前, 该方面的研究已成为生殖生物学的一个新领域。工作主要集中于研究某些 MMPs 和 TIMPs 在卵巢中的时空表达及其与激素、细胞因子和生长因子等的相互作用关系, 已鉴定出参与调控的一些重要成员及部分的调节因子, 为深入研究卵巢功能的分子机制提供了新的思路。进一步的工作仍需全面分析 MMPs/TIMPs 成员在卵巢中的时空表达, 并开展调控机制研究, 阐明与 MMPs/TIMPs 相关的信号通路, 以充分揭示该系统在卵巢功能调控网络中的地位和作用。

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号: 39970106)和中国科学院知识创新工程经费资助项目。

参 考 文 献

1 Woessner J F, Nagase H. Matrix Metalloproteinases and TIMPs. New York: Oxford University Press, 2000. 1~96

2 Lohi J, Wilson C L, Roby J D, et al. Epilysin, a novel human matrix metalloproteinase (MMP-28) expressed in testis and keratinocytes and in response to injury. *J Biol Chem*, 2001, 276(13): 10134~10144

3 Curry T E Jr, Osteen K G. Cyclic changes in the matrix metalloproteinase system in the ovary and uterus. *Biol Reprod*, 2001, 64(5): 1285~1296

4 Bagavandoss P. Differential distribution of gelatinases and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in the rat ovary. *J Endocrinol*, 1998, 158(2): 221~228

5 Balbin M, Fueyo A, Lopez J M, et al. Expression of collagenase-3 in the rat ovary during the ovulatory process. *J Endocrinol*, 1996, 149(3): 405~415

6 Huet C, Monget P, Pisselet C, et al. Changes in extracellular matrix components and steroidogenic enzymes during growth and atresia of antral ovarian follicles in the sheep. *Biol Reprod*, 1997, 56(4): 1025~1034

7 Bogusiewicz M, Rechberger T, Jakimiuk A J, et al. Evaluation of matrix metalloproteinases-1 and -3 concentrations in the tunica albuginea, the apical wall of atretic follicles and the corpus luteum of normal human ovaries. *Gynecol Endocrinol*, 2000, 14(1): 25~31

8 Fata J E, Ho A T, Leco K J, et al. Cellular turnover and extracellular matrix remodeling in female reproductive tissues: functions of metalloproteinases and their inhibitors. *Cell Mol Life Sci*, 2000, 57(1): 77~95

9 Chaffin C L, Stouffer R L. Expression of matrix metallopro-

teinases and their tissue inhibitor messenger ribonucleic acids in macaque periovulatory granulosa cells: time course and steroid regulation. *Biol Reprod*, 1999, 61(1): 14~21

10 Smith M F, McIntush E W, Ricke W A, et al. Regulation of ovarian extracellular matrix remodeling by metalloproteinases and their tissue inhibitors: effects on follicular development, ovulation and luteal function. *J Reprod Fertil (Suppl)*, 1999, 54: 367~381

11 Liu K, Walhlberg P, Ny T. Coordinated and cell-specific regulation of membrane type matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP) and its substrate matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) by physiological signals during follicular development and ovulation. *Endocrinology*, 1998, 139(11): 4735~4738

12 Kimura A, Kihara T, Ohkura R, et al. Localization of bradykinin B(2) receptor in the follicles of porcine ovary and increased expression of matrix metalloproteinase-3 and -20 in cultured granulosa cells by bradykinin treatment. *Biol Reprod*, 2001, 65(5): 1462~1470

13 李庆雷, 王红梅, 邵龙江, 等. 基质金属蛋白酶-2, -9 及其组织抑制因子在恒河猴黄体中的表达. *科学通报*, 2001, 46(6): 481~485

14 Curry T E Jr, Song L, Wheeler S E. Cellular localization of gelatinases and tissue inhibitors of metalloproteinases during follicular growth, ovulation and early luteal formation in the rat. *Biol Reprod*, 2001, 65(3): 855~865

15 Seandel M, Noack-Kunmann K, Zhu D, et al. Growth factor-induced angiogenesis in vivo requires specific cleavage of fibrillar type I collagen. *Blood*, 2001, 97(8): 2323~2332

16 Goto T, Endo T, Henmi H, et al. Gonadotropin-releasing hormone agonist has the ability to induce increased matrix metalloproteinase (MMP-2) and membrane type 1-MMP expression in corpora lutea, and structural luteolysis in rats. *J Endocrinol*, 1999, 161(3): 393~402

17 Duncan W C, McNeilly A S, Illingworth P J. The effect of luteal "rescue" on the expression and localization of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in the human corpus luteum. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998, 83(7): 2470~2478

18 Furuya M. Analysis of matrix metalloproteinases and related tissue inhibitors in cystic fluids of ovarian tumors. *Hokkaido Igaku Zasshi*, 1999, 74(2): 145~155

19 Shigemasa K, Tanimoto H, Sakata K, et al. Induction of matrix metalloproteinase-7 is common in mucinous ovarian tumors including early stage disease. *Med Oncol*, 2000, 17(1): 52~58

20 Shalev E, Goldman S, Ben-Shlomo I. The balance between MMP-9 and MMP-2 and their tissue inhibitor (TIMP)-1 in luteinized granulosa cells: comparison between women with PCOS and normal ovulatory women. *Mol Hum Reprod*, 2001, 7(4): 325~331

(2001-11-16 收稿, 2002-04-10 收修改稿)