

综述

HIF-1 α 对卵泡发育及排卵生物学作用的研究进展

马林纳¹, 马堃^{2,*}, 范晓迪^{3,*}, 张涵¹, 李佳妮⁴, 高山凤⁴

¹天津中医药大学研究生院, 天津 301617; ²中国中医科学院继续教育处, 北京 100700; ³中国中医科学院西苑医院基础医学研究所中药药理北京市重点实验室, 北京 100091; ⁴中国中医科学院西苑医院妇科, 北京 100091

摘要: 低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)作为缺氧感应因子, 通过调控卵泡的发育和排出影响女性的生殖功能。HIF-1 α 促进卵母细胞发育, 调控其分泌相关血管生成因子, 诱导颗粒细胞进行糖酵解、自噬, 提高卵泡成熟率。此外, HIF-1 α 推动卵泡囊黄体化进程, 维持黄体功能, 最终通过累积氧化应激完成生理性黄体萎缩。若HIF-1 α 调控功能异常, 则会引起血管新生障碍、能量代谢失常、过度氧化应激和异常自噬-凋亡等一系列病理反应, 导致排卵障碍性不孕的发生。本文通过对近期关于HIF-1 α 调控卵泡发育、排出, 以及黄体功能维持和结构萎缩的研究进行总结, 阐述相关药物或有效成分通过HIF-1 α 对卵泡发育不良和卵子排出障碍的有效干预机制, 以期为解决排卵障碍性不孕提供更系统、深入的研究思路。

关键词: 低氧诱导因子-1 α ; 卵泡发育; 排卵过程

Research progress on the biological effects of HIF-1 α on follicle development and ovulation

MA Lin-Na¹, MA Kun^{2,*}, FAN Xiao-Di^{3,*}, ZHANG Han¹, LI Jia-Ni⁴, GAO Shan-Feng⁴

¹Graduate School, Tianjin University of Chinese Medicine, Tianjin 301617, China; ²Department of Continuing Education, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; ³Beijing Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Pharmacology, Institute of Basic Medical Sciences, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China; ⁴Gynecology Department, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China

Abstract: Hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α), as a hypoxia inducible factor, affects women's reproductive function by regulating the development and excretion of follicles. HIF-1 α induces glycolysis and autophagy in the granule cells by promoting oocyte development, regulating the secretion of related angiogenic factors, and improving follicle maturity. In addition, HIF-1 α promotes the process of luteinization of follicular vesicles, maintains luteal function, and finally completes physiological luteal atrophy through cumulative oxidative stress. Dysfunction of HIF-1 α will cause a series of pathological consequences, such as angiogenesis defect, energy metabolism abnormality, excessive oxidative stress and dysregulated autophagy and apoptosis, resulting in ovulation problem and infertility. This article summarizes the previous studies on the regulation of follicle development and excretion and maintenance of luteal function and structural atrophy by HIF-1 α . We also describe the effective intervention mechanism of related drugs or bioactive ingredients on follicular dysplasia and ovulation disorders through HIF-1 α , in order to provide a systematic and in-depth insights for solving ovulation disorder infertility.

Key words: hypoxia inducible factor-1 α ; follicular development; ovulation

This work was supported by the Science and Technology Innovation Project of China Academy of Chinese Medical Sciences (No. CI2021A02406), Beijing Natural Science Foundation (No. 7212193), and Beijing Science and Technology Plan (No. Z171100001017104).

*Corresponding authors. MA Kun: E-mail: mkun1230@163.com; FAN Xiao-Di: xiaodi.1018@163.com

卵泡发育不良和 (或) 卵子排出障碍极易引起早发性卵巢功能不全 (premature ovarian insufficiency, POI)、卵巢早衰 (premature ovarian failure, POF)、多囊卵巢综合征 (polycystic ovarian syndrome, PCOS)、未破裂卵泡黄素化综合征 (luteinized unruptured follicle syndrome, LUFS) 等排卵障碍性疾病, 其患者在女性不孕症患者中占 25%~35%^[1, 2]。临床目前以激素诱导排卵和辅助生殖技术作为主要治疗手段, 但临床妊娠率只有 30%~50%, 且妊娠后自然流产率高达 15%^[3], 其原因是未从根本上改善卵泡质量。

哺乳动物卵泡内无血管生长, 因此其发育过程长期处于生理缺氧状态。低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α) 是哺乳动物调节缺氧状态的关键因子^[4], 通过参与调控、诱导卵巢内与生殖相关的各类细胞生理、病理反应, 影响卵泡发育、卵子排出。因此, 探索卵泡中以 HIF-1 α 通路为代表的缺氧反应机制一直是生殖领域的研究焦点。本文通过总结与卵泡相关的 HIF-1 α 调控机制以及药物的干预研究, 以期为临床治疗相关疾病提供研究思路 and 理论支持。

1 HIF-1 α 的功能特性

低氧诱导因子 1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 是具有转录活性的核蛋白, 密切参与常氧、缺氧环境中的基因转录、蛋白稳定性、蛋白核移位、蛋白质聚合、转录激活等活动。HIF-1 主要组成部分是组成性表达亚基 HIF-1 β 和具有相同二聚化特性和 DNA 结合结构域的氧高度敏感活性亚基 HIF-1 α 。HIF-1 β 不受氧的影响, 且其在大多数组织中以 HIF-1 α 亚基、芳基化合物受体以及 bHLH-PAS (basic-helix-loop-helix-Per-Arnt-Sim) 的结合伴侣形式进行表达。HIF-1 α 肽链的游离羧基端为氧依赖降解 (oxygen-dependent degradation, ODD) 结构域; 靠近 ODD 结构域为具有精细调节功能的 C-端转录激活结构域 (C-transactivation domain, C-TAD); 靠近游离氨基端为具有抵抗低氧条件下 HIF-1 α 降解的 N-端转录激活结构域 (N-transactivation domain, N-TAD); C-TAD 和 N-TAD 间的抑制结构域可降低 HIF-1 α 的转录激活结构域的活性^[5]。

在常氧条件下, HIF-1 α 被脯氨酰羟化酶 (prolyl hydroxylase, PHD) 羟基化后, 林希因子 (von Hippel-Lindau tumour suppressor protein, pVHL) 将其快速识别并泛素化降解。在缺氧条件下, HIF-1 α 的 PHD

羟基化被阻断, pVHL 无法识别 HIF-1 α 亚基、泛素化降解失败, HIF-1 α 蛋白得以稳定积聚并迁移至细胞核内, 与 HIF-1 β 形成异源二聚体转录因子, 结合靶基因的缺氧反应元件 (hypoxia-response element, HRE), 激活缺氧反应基因, 促进下游相关靶基因的表达^[6], 基本过程为 HIF-1 α mRNA 的 5' UTR 内部核糖体进入位点, 完成核糖体结合; 其 3' UTR 与多聚嘧啶束结合蛋白、5' UTR 与 RNA 结合蛋白分别结合, 促进 HIF-1 α 翻译^[7]; HIF-1 α mRNA 与热休克蛋白 90、活化蛋白激酶 C 受体 1 相结合起到稳定表达 HIF-1 α 蛋白的作用^[8] (图 1)。

2 HIF-1 α 调控卵泡发育和排卵过程

女性进入青春期后由前颗粒细胞围绕初级卵母细胞所形成的始基卵泡开始启动发育, 通过血管新生、能量代谢等一系列活动完成窦前卵泡-窦卵泡-排卵前卵泡这一发育过程。当卵泡膜破裂、卵子顺利排出后, 卵泡囊内颗粒细胞 (granulosa cell, GC) 通过自噬等形式完成黄体化。黄体期具有维持卵巢功能、有利于受精卵的着床和发育的作用, 若卵子未受精则黄体自然萎缩并开始下一个生殖周期^[9]。

2.1 HIF-1 α 对血管新生的调控作用

血管新生在卵泡中的存在形式以出芽式和小管式为主, 新生血管的密度以及其供给的血流量与卵泡发育、优势卵泡的选择直接相关, 而成熟卵泡的顺利排出依赖于卵泡膜新生血管的强烈收缩^[10]。

在卵泡发育期, 氧消耗增大导致卵泡液中氧浓度降低, HIF-1 α 被轻度缺氧生态位激活, 诱导下游信号通路, 控制血管的分解和重建^[11]。Shimizu 等^[12]研究显示, 给小鼠卵巢直接注射血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 基因片段可促进卵泡膜血管生长, 减少闭锁卵泡数量。He 等^[13]采用不同氧浓度梯度培养牦牛卵丘-卵母细胞复合体 (cumulus-oocyte complexes, COCs), 发现 HIF-1 α 、VEGF 蛋白主要在卵母细胞 (而不是 GC) 中表达, 且 mRNA 表达水平与卵母细胞成熟率呈正相关。此外 Guo 等研究显示, HIF-1 α /PI3K-Akt 通路表达升高可刺激下游血小板源生长因子 β (platelet-derived growth factor β , PDGF- β) 蛋白表达, 促使血管平滑肌细胞增殖和新生血管成熟^[14]。Masoud 等研究显示, 在卵泡发育期 HIF-1 α 主要由卵母细胞高表达, 继而诱导相关血管生成因子, 促进卵泡膜形成高通透性新生血管、增加血管密度^[15], 提高卵泡成熟率、

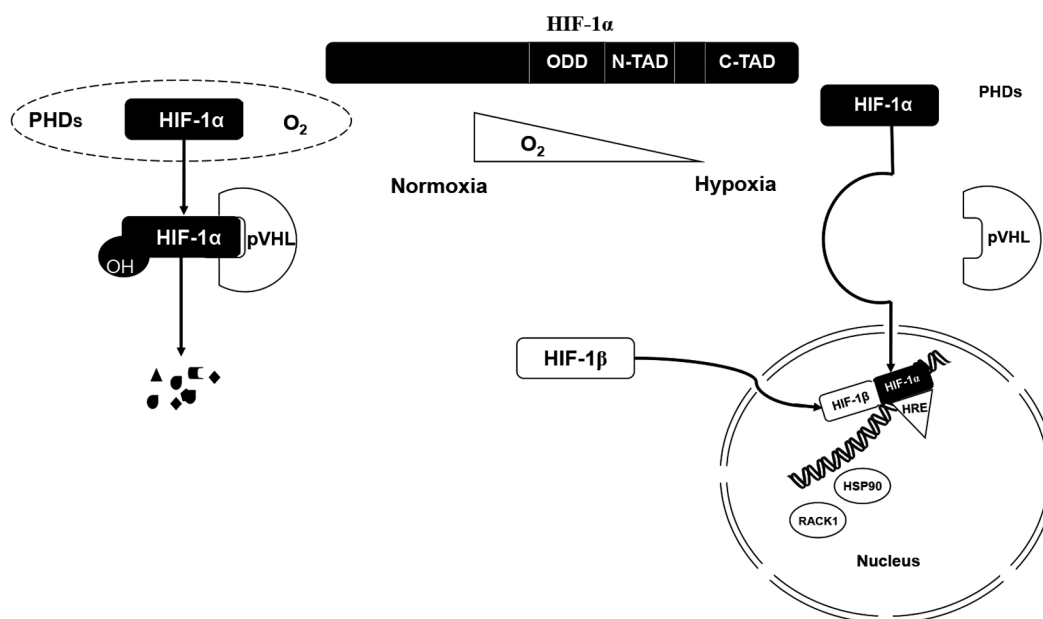


图 1. 低氧诱导因子-1 (HIF-1)活性的调节机制示意图

Fig. 1. Schematic diagram of regulatory mechanisms of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) activity. HIF-1 is a heterodimeric transcription factor complex consisting of two subunits, HIF-1 α and HIF-1 β . In normoxia environment, HIF-1 α is rapidly ubiquitinated and degraded. In a hypoxic environment, blockade of PHD hydroxylation of HIF-1 α leads to increased expression level, and HIF-1 α interacts with HIF-1 β to promote HIF-1 target gene transcription. ODD, oxygen-dependent degradation domain; N-TAD, N-transactivation domain; C-TAD, C-transactivation domain; PHDs, prolyl hydroxylases; pVHL, von Hippel-Lindau tumour suppressor protein; HRE, hypoxia-response element; HSP90, heat shock protein 90; RACK1, receptor for activated kinase C1.

减少闭锁卵泡^[16]。

在排卵期, GC 表达的 HIF-1 α 促进卵泡膜新生血管收缩, 诱导卵泡周围平滑肌紧张, 最终使卵泡中成熟卵子排出。Li 等研究^[17]显示, 小鼠卵巢中 HIF-1 α 、VEGFA、CD34 和 CD31 蛋白集中由 GC 表达, 腹腔注射促卵泡激素 (follicle-stimulating hormone, FSH) 后 VEGFA、HIF-1 α 基因表达上调, 而 HIF-1 α 抑制剂 PX-478 可抑制 FSH 的诱导效应, 降低卵泡膜血管生成率, 增加闭锁卵泡率, 但不降低卵泡发育率, 提示与发育期不同, 卵泡排卵期主要由 GC 表达 HIF-1 α /VEGFA, 调控血管新生; 单一抑制 HIF-1 α 对卵泡发育的影响有限, 但会造成排卵障碍。Wang 等^[18]用过双链寡聚脱氧核苷酸转染小鼠 GC, 发现抑制 HIF-1 α 转录使具有强收缩血管作用的内皮素-2 (endothelin-2, ET-2) mRNA 表达下调, 显著降低排卵率。Szymanska 等^[19]用低氧激活因子 microRNA-210 处理 PCOS 患者卵巢 GC, 发现其 HIF-1 α 、ET-2、VEGFA 蛋白表达趋势升高, 卵泡成熟率和排卵率同步提高, 提示在排卵阶段 GC 通过 HIF-1 α /VEGFA 增加卵泡膜血管通透性, 并联合

HIF-1 α /ET-2 高表达促使卵泡膜血管新生和卵泡周围平滑肌层强收缩, 达到使卵泡膜破裂、卵子顺利排出的目的。

在黄体期, 黄体功能的维持依赖于黄体血管化状态和充足的血液灌注, 避免其发生功能性和结构性黄体溶解。Papa Pde 等^[20]动态监测实验犬黄体期, 发现初期黄体细胞 HIF-1 α /VEGFA 信号通路高表达, 但后期 VEGFA 表达逐渐降低; 与此同时成纤维细胞生长因子 2 (fibroblast growth factor 2, FGF2) 蛋白表达逐渐上调。Woad 等^[21]分别用 FGF2 活性抑制剂 SU5402 和 VEGFA 活性抑制剂 SU1498 处理牛黄体细胞, 发现 SU5402 组内皮细胞网总面积在第 3~6 天黄体期减少 81%, 抑制解除后血管以发芽和小管样生长快速重组, 而 SU1498 组内皮细胞网总面积在任何时间窗均无变化, 但黄体体积萎缩 50%, 提示黄体初期在 HIF-1 α 调控下 FGF2 是萌发内皮细胞、启动小管生成的关键, 而 VEGFA 影响整个黄体期寿命。

2.2 HIF-1 α 对能量代谢的调控作用

人体内能量代谢主要包括糖代谢、脂代谢和氨

基酸代谢。自卵泡发育开始, 卵泡内 GC 层逐渐增厚, 里层 GC 从卵泡膜血管获氧、获能途径被限制。因此, 在发育过程中 GC 须在克服缺氧环境前提下完成内部能量代谢。

在卵泡中糖代谢途径主要有氧糖代谢、无氧糖酵解和磷酸戊糖旁路。Zhang 等^[22]对不同生殖阶段的小鼠卵泡进行检测, 发现有氧糖代谢、磷酸戊糖旁路主要参与前 GC 代谢, 与 GC、卵母细胞关系并不紧密, 卵泡中前 GC 细胞数量极少, 自身能量代谢不能满足卵泡发育。此外, 在小鼠原始卵泡向初级卵泡转化过程中内部缺氧环境导致 GC 有氧糖代谢 - 线粒体氧化磷酸化 (oxidative phosphorylation, OXPHOS) 被抑制, 转换为无氧糖酵解^[23]。Li 等^[24]在体外缺氧环境 (1% O₂) 中培养猪 GC, 发现 GC 中 HIF-1 α 基因特异性表达升高, 诱导糖酵解关键酶腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, AMPK), 靶向上调葡萄糖转运蛋白 1 (glucose transporter 1, GLUT1) 基因表达, HIF-1 α 抑制剂 PX-478 下调 GC 中 p-AMPK、GLUT1 表达水平, AMPK 抑制剂化合物 C 可抑制 GC 中 GLUT1 的高表达, 提示 HIF-1 α 通过上调 AMPK/GLUT1 表达促进 GC 摄取葡萄糖, 生成丙酮酸和腺苷三磷酸 (adenosine triphosphate, ATP), 完成这一糖酵解行为后以异源缝隙连接形式转移丙酮酸, 并以颗粒间隙连接形式输送 ATP 到卵母细胞, 促使其发育。

目前尚无关于 HIF-1 α 调控脂代谢、氨基酸代谢的相关研究。然而, 卵母细胞是发生脂代谢的主要场所, 有研究者发现在卵母细胞中脂滴与线粒体位置相邻, 以便于脂肪酸运送至线粒体进行氧化^[25], 而氨基酸代谢紊乱会导致卵母细胞中线粒体的结构和功能异常^[26]。因此, 后续可以围绕 HIF-1 α 如何通过此两种代谢途径影响卵泡发育、排出, 开展针对性研究。

2.3 HIF-1 α 对自噬-凋亡的调控作用

自噬 - 凋亡是细胞死亡机制的连续阶段。在卵泡发育过程中, 与衰老相关的分解代谢废物大量堆积, 自噬通过捕获、降解细胞内异常蛋白质和受损细胞器来维持卵泡稳态, 而当代谢废物聚集量超过自噬清除能力时, 自噬功能丧失, 引发凋亡。

在卵泡期和黄体期, HIF-1 α 诱导信号通路通过提高自噬率保护 GC, 使其免于凋亡。Zhou 等^[27]用氯化钴 (cobaltchloride, CoCl₂) 模拟缺氧环境培养

小鼠卵泡, 发现自噬主要标记物微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule associated protein 1 light chain 3, LC3) 的胞浆型 (LC3-I)、膜型 (LC3-II) 在 GC 而非卵母细胞中高表达, 用 siRNA HIF-1 α 转染 GC, 其 HIF-1 α 表达被抑制、LC3 荧光面积减少, 自噬体降解标志蛋白 p62 (又称为 sequestosome-1, SQSTM1) 增加, 表明 HIF-1 α 促进下游 LC3-I、LC3-II 高表达, 即卵泡发育伴随 GC 自噬率升高。Tang 等^[28]用碳酸二甲酯 (dimethyl carbonate, DMC) 诱导小鼠卵泡自噬, 结果显示中、高剂量 DMC 组 HIF-1 α 、Bcl-2- 腺病毒 E1B 相互作用蛋白 3 (Bcl-2-adenovirus E1B 19-kDa interacting protein 3, BNIP3)、Bcl-2、Beclin-1 表达水平下调, 而在低剂量 DMC 组表达水平显著上调, 提示过度诱导自噬反而会导致凋亡发生。Tang 等研究显示, 3- 甲基腺嘌呤 (3-methyladenine, 3-MA) 可抑制低氧对自噬的诱导, 激活 GC 中 caspase-3、提高细胞凋亡水平^[29]。以上结果表明, HIF-1 α /BNIP3 是参与自噬调节的关键途径, 通过上调 Bcl-2 蛋白表达维持细胞存活, 并诱导 GC 自噬, 抑制细胞凋亡, 共同保护卵泡发育。

Fadhillah 等^[30]用人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, hCG) 处理黄体细胞, 结果显示黄体细胞中自噬体含量增加, 敲除 Beclin-1 RNA 使甾体类生成快速调节 (steroidogenetic acute regulatory, StAR) 蛋白表达水平下调, 表明黄体的发育和功能维持依赖自噬活动; 棘霉素可抑制黄体化的标志物 StAR 表达, 上调 Bax、caspase-3 表达、提高细胞凋亡水平, 但对 Bcl-2 表达没有明显作用, 提示 HIF-1 α 通过诱导自噬促进 GC 的黄体化, 当自噬被抑制则凋亡水平增加。Tang 等^[31]研究显示, 大鼠黄体期第 1 天 HIF-1 α /BNIP3/NIX 表达水平高于第 4、10 天, 而 HIF-1 α mRNA 在前两个时间点未有明显变化, 提示在排卵后的黄体形成过程中缺氧状态诱导 HIF-1 α 蛋白高表达, 并激活下游 BNIP3/NIX 诱导自噬; 第 1 天的 Bcl-2/BNIP3 复合体的水平远高于后两个时间节点, 而 Bcl-2/Beclin-1 复合物的水平变化呈相反的趋势。上述结果表明 HIF-1 α 诱导 BNIP3 的表达, 并通过与 Bcl-2 竞争结合, 破坏预先存在的 Bcl-2/Beclin-1 复合物, 形成 Bcl-2/BNIP3 复合物, 被释放的 Beclin-1 在黄体形成过程中激活自噬。

目前对于卵泡内 HIF-1 α 通过何种细胞器主导自噬 - 凋亡这一过程存在争议, 不过 Zhang 等^[32]

研究显示,在受损心肌细胞中 BNIP3 可作为线粒体选择性自噬降解的标志物,线粒体 HIF-1 α /BNIP3 信号通路高表达,参与受损线粒体的自噬清除,并通过阻止 Bcl-2 与 Beclin-1 的结合来激活自噬,并释放 Beclin-1 以刺激心肌细胞凋亡,因此我们推测 HIF-1 α /BNIP3 信号通路可能通过调控线粒体稳态影响卵母细胞和 GC 自噬-凋亡过程。

2.4 HIF-1 α 对氧化应激的调控作用

氧化应激是自由基积累量超过内源性抗氧化系统清除水平而导致的氧化还原失衡状态^[33]。95% 的自由基属于活性氧 (reactive oxygen species, ROS), ROS 作为细胞信号的第二信使,在调节卵泡发育和卵子排出中起到重要作用^[34]。

HIF-1 α 高表达可引起氧化应激,损伤为卵泡发育供应能量的 GC,最终导致卵泡闭锁。研究显示,低氧环境下 GC 核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 与其靶基因 HIF-1 α 启动子上游位点 (-197/-188 bp) 结合,上调 HIF-1 α 、一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 的 mRNA、蛋白表达水平,导致 ROS 过量产生,进而导致 DNA 加合物 8-羟基脱氧鸟苷 (8-hydroxy-2 deoxyguanosine, 8-OHDG) 和脂质过氧化物 4-羟基壬烯醛 (hydroxynonenal, 4-HNE) 的形成,引起 GC 的 DNA 损伤和基因异常表达,由此带来细胞信号通路和表观遗传改变的积累,最终造成卵泡异常闭锁、甚至卵巢衰老^[35,36]。

HIF-1 α 促进 ROS 积累与黄体的萎缩高度相关。在人类^[37]和大鼠^[38]的黄体萎缩期, HIF-1 α 表达水平及其下游 BNIP3、NIX、ROS 积累量同步增加,而线粒体吞噬 PTEN 诱导假定激酶 1 (PTEN induced putative kinase 1, PINK1)、线粒体标记蛋白电压依赖性阴离子通道 (voltage-dependent anion channel, VDAC) 减少,用棘霉素处理黄体后 HIF-1 α 介导的 BNIP3、NIX 信号通路被抑制, ROS 积累量减少、黄体结构萎缩推迟,表明线粒体稳态被高积累量 ROS 破坏后造成降解,促使黄体功能衰退继而萎缩,而通过抑制 HIF-1 α 诱导的氧化应激信号通路可延缓黄体萎缩。

综上所述,在卵泡发育期 HIF-1 α 可以通过诱导卵泡膜血管新生、促进 GC 糖酵解代谢和自噬、降低凋亡和氧化应激水平,从而推动卵母细胞以及整个卵泡的发育;在排卵阶段, HIF-1 α 调控收缩卵泡周围平滑肌层和卵泡膜血管,促进卵泡膜破裂,帮助卵子顺利排出。排卵后的卵泡囊内 HIF-1 α 激

活 GC 自噬,将其转化为黄体细胞;在黄体期, HIF-1 α 通过新生血管、自噬和清除过量氧化应激维持黄体功能;在黄体萎缩期, HIF-1 α 启动凋亡和累积足量 ROS 促使黄体顺利萎缩 (图 2)。

3 调控HIF-1 α 的靶向药物及有效成分

诸多干预排卵障碍的相关研究表明,多种药物可通过不同机制作用于 HIF-1 α 通路,发挥调控排卵过程的作用。Zhou 等^[39]用四物汤干预 PO F 小鼠模型,发现模型小鼠窦卵泡和颗粒黄体细胞中的卵泡膜细胞内 p-STAT3 表达显著上调,且卵巢 STAT3/HIF-1 α /VEGF 蛋白通路、血管内皮细胞标记物 CD31 和周细胞标记物 α -SMA 高表达,卵泡成熟率提高,提示四物汤主要通过维持排卵期、黄体形成期的血管新生和血管稳定性促进卵泡发育。Liu 等^[40]研究显示,含有逍遥丸成分的大鼠血清处理可上调 LUFS 体外细胞模型 HIF-1 α 、ET-2 蛋白表达,增强卵泡周围平滑肌收缩、增大卵泡压力,同时增强 HIF-1 α 调控的 I 型血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶 (adisinintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs-1, ADAMTS-1) 活性,裂解 COCs 基质多功能蛋白聚糖,从而破坏基质结构的完整性,诱导卵泡破裂、促进卵子排出。Xie 等^[41]研究显示,壳寡糖抑制氧化应激诱导的 PCOS 患者原代 GC HIF-1 α /ROS 表达水平上调,降低 GC 凋亡率,表明壳寡糖可抑制 HIF-1 α /ROS 高表达导致的 GC 病理性氧化应激,从而改善卵泡闭锁。

与本文 2.3 节中所述 HIF-1 α /BNIP3 信号通路通过激活自噬促进卵泡发育的多项研究有所不同的是, Zhu 等^[42]研究显示,在环磷酸腺苷诱导的卵巢储备功能减弱小鼠模型中 HIF-1 α /BNIP3 蛋白高强度表达,通过抑制 mTOR 激活 GC 自噬,并与 Bcl-2 结合解离 Beclin-1,引发 GC 坏死和凋亡,在采用麒麟丸及其主要成分金丝桃苷干预后, HIF-1 α /BNIP3/Beclin-1 阳性表达明显降低,卵泡衰竭和闭锁率也明显下降, Zhu 等^[42]认为 HIF-1 α 升高反映内环境缺氧加剧, GC 被过度激活导致自身的死亡;用金丝桃苷处理人卵巢 GC 的 KGN 模型,结果显示 GC 中自噬标志蛋白 LC3B 和 P62 表达水平下调,线粒体外膜 BNIP3 表达被抑制、膜电位恢复,核内 HIF-1 α 蛋白表达降低, KGN 细胞增殖率提高,提示麒麟丸的主要成分金丝桃苷可通过抑制 GC 内与缺氧相关的自噬过度激活,避免卵泡凋亡。以上研

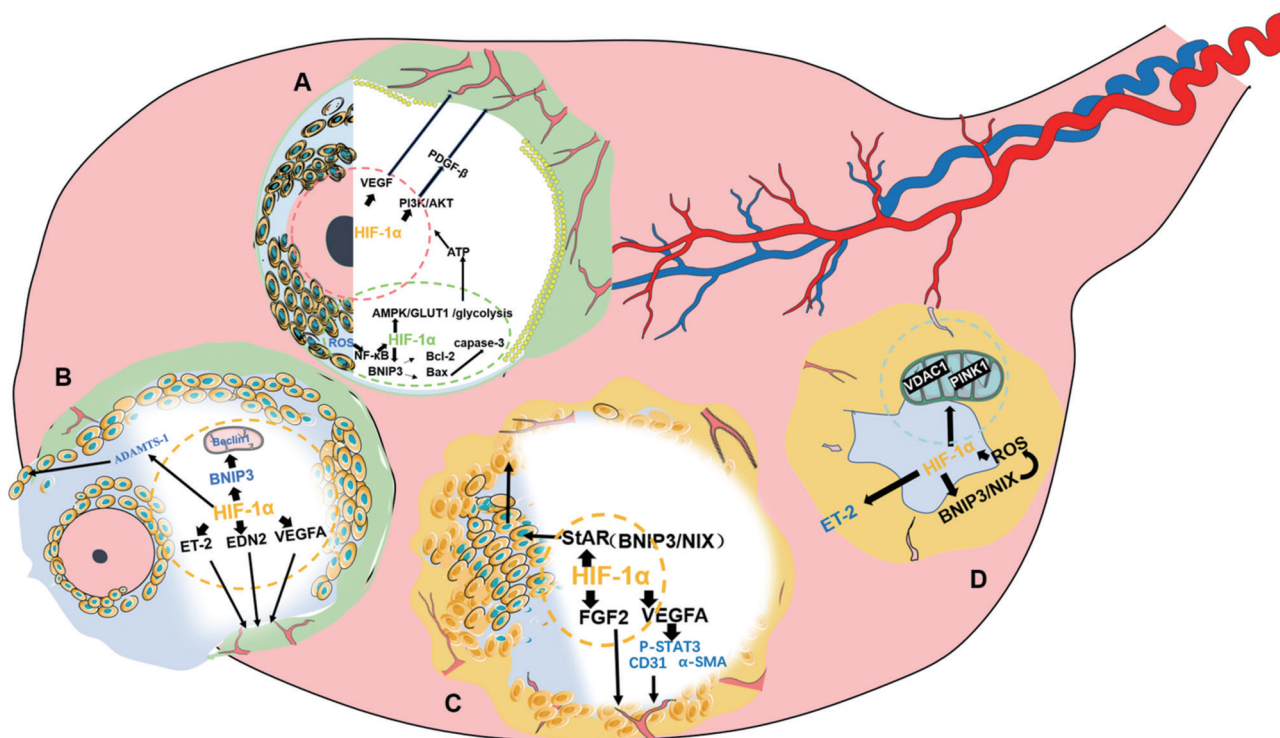


图 2. 低氧诱导因子1 α (HIF-1 α)调控卵泡发育和排卵作用机制及药物作用途径模式图

Fig. 2. Diagram of the regulatory mechanism of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) on follicle development and ovulation and drug pathway mode of action. *A*: Follicle development: Granule cells are energized for oocyte development through glycolysis, and oocyte secretion of relevant regulatory factors promotes follicular membrane vascular growth. *B*: Follicle discharge phase: Granule cell secretion of relevant regulators induces the breakdown of the vascular wall of the follicular membrane and the contraction of the smooth muscle layer, promoting the rupture of the follicular membrane. *C*: Luteal phase: HIF-1 α maintains luteal function by promoting granular cell luteinization and luteal angiogenesis. *D*: Luteal atrophy: HIF-1 α atrophies the structure by inducing high-intensity oxidative stress. VEGF, vascular endothelial growth factor; PDGF- β , platelet-derived growth factor β ; ATP, adenosine triphosphate; AMPK, adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase; GLUT1, glucose transporter 1; BNIP3, Bcl-2-adenovirus E1B 19-kDa interacting protein 3; NF- κ B, nuclear factor- κ B; ROS, reactive oxygen species; ET-2, endothelin-2; ADAMTS-1, adisintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs-1; StAR, steroidogenic acute regulatory; FGF2, fibroblast growth factor 2; PINK1, PTEN induced putative kinase 1; VDAC, voltage-dependent anion channel.

究结果提示, HIF-1 α 介导的同一通路在不同种属, 甚至在同一物种不同时期的卵泡内表达都有可能致完全不同的结果, 而这也是接下来探索 HIF-1 α 功能的重点、难点。

目前对于临床治疗药物与 HIF-1 α 的相关性研究较少, 上述药物作用靶点和研究有待进一步完善和探索

4 总结

卵泡发育不足和排卵障碍是导致排卵障碍性不孕的主要病理因素, 其直接原因是卵母细胞发育异常、GC 供能不足、卵泡成熟不破。HIF-1 α 在卵泡的发育和排出过程中均发挥重要调控作用。因此,

探究 HIF-1 α 调控卵泡的信号通路可以为解决、改善排卵障碍性不孕提供思路。

在卵泡发育期, GC 中 HIF-1 α 调控无氧糖酵解为卵母细胞供能, 而妇科领域有氧糖酵解的研究主要集中在肿瘤领域, 但有证据表明人卵丘细胞以及 GC 黄体化时有氧糖酵解速率同步升高^[43], 因此可进一步研究 HIF-1 α 在无氧糖酵解和有氧糖酵解之间是否有联通或顺承关系。在卵泡发育期 HIF-1 α /PI3K/Akt/PDGF- β 信号通路可促进血管新生使卵泡发育成熟^[14], 而 Agani 等^[44] 在卵巢癌研究中发现 PI3K/Akt 高表达可通过减少糖原合成加强糖酵解。此外, PI3K/Akt 这一通路与磷脂酰肌醇密切相关, 直接参与蛋白转录、细胞迁移、葡萄糖代谢、氨基

酸代谢、细胞增殖、细胞凋亡等生物活动,目前针对卵泡中 HIF-1 α 调节能量代谢的研究尚不充分,可对 HIF-1 α /PI3K/Akt 通路下游其它目标蛋白进行探索,以期发现更多卵泡发育和排出的调控机制。

Zou 等研究显示,在体外实验中,虽然在低氧状态下 HIF-1 α 可通过诱导下游因子促进人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 微血管生成,但当氧浓度低于诱导阈值时 HIF-1 α 失去激活作用^[45]。此外,人卵泡发育过程中,卵泡初期 ROS 水平的增加有利于卵母细胞减数分裂恢复和第一极体挤压,但 ROS 过量积累会造成 GC 与卵母细胞之间通讯不良,影响卵母细胞质量和成熟^[45,46],这表明 HIF-1 α 对于不同程度的相同诱因有双面反应,而对于双面反应的 HIF-1 α 阈值还未有定论。因此,探究 HIF-1 α 诱导的某一信号通路在同一发育时期不同时间节点的差异化原因,是完成以 HIF-1 α 为核心的网状研究的重点。

受限于伦理和人卵泡的不易得性,相关机制研究的体内模型多采用大、小鼠啮齿类动物,体外细胞模型多从牛、猪卵巢中提取,不同动物卵泡期、黄体期时长各不相同,且体外模拟缺氧也与人体卵巢微环境生理缺氧状态并不完全一致。排卵障碍性不孕的临床实验结果显示,ET-2 可收缩排卵期卵泡周围的平滑肌层触发卵泡破裂^[46],但在小鼠体内的研究结果显示,血管通透性因子 VEGFA 帮助卵泡膜血管壁分解、促进卵子排出^[47]。这两个细胞因子在排卵过程中谁为主导、是否存在协同作用,需进一步研究。因此,动物实验中 HIF-1 α 相关调控通路与人体吻合性需再加以论证。

综上,关于 HIF-1 α 的研究多集中于卵泡发育期,而在排卵期、黄体期和黄体萎缩期的研究相对较少。后续研究可从传统的单组学研究转向基因组学、转录组学、蛋白质组学和代谢组学的多组学联合分析,从整体上揭示 HIF-1 α 在排卵调控中的生理、病理作用。在今后的实验中可通过控制实验条件、缩小动物模型与人体环境的差异性,探究 HIF-1 α 的“激活点”、起反向调控作用的“临界点”以及“终止点”,更高效地寻找靶向药物和有效成分,为临床治疗提供支持。

参考文献

- 1 Shan HP (单海萍), Xu XF. Research progress in the treatment of ovulation disorder infertility in traditional Chinese medicine. *J Liaoning Univ Chin Med* (辽宁中医药大学学报) 2021; 23(7): 139–143 (in Chinese).
- 2 Liu XQ (刘晓倩), Ma K, Yang B, Zhang XD, Yin YD. Ovulation disorder disease “different diseases and treatment”: Discussion on the nature of “Tianxi” and its relationship with ovulation disorder disease. *Chin J Tradit Chin Mater Med* (中国中药杂志) 2022; 47(12): 3397–3401 (in Chinese).
- 3 Pourakbari R, Ahmadi H, Yousefi M, Aghebati-Maleki L. Cell therapy in female infertility-related diseases: Emphasis on recurrent miscarriage and repeated implantation failure. *Life Sci* 2020; 258: 118181.
- 4 Boonyaparakob U, Gadsby JE, Hedgpeth V, Routh PA, Almond GW. Expression and localization of hypoxia inducible factor-1 α mRNA in the porcine ovary. *Can J Vet Res* 2005; 69: 215–222.
- 5 Huang LL (黄玲玲), Zhou YW, Ping Y. Research progress of hypoxia-inducible factor-1 in gynecological malignancies. *Mod Oncol* (现代肿瘤医学) 2021; 29(15): 2745–2748 (in Chinese).
- 6 Semenza GL. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13: 167–171.
- 7 Wang X, Li L, Zhao K, Lin Q, Li H, Xue X, Ge W, He H, Liu D, Xie H, Wu Q, Hu Y. A novel lncRNA HITT forms a regulatory loop with HIF-1 α to modulate angiogenesis and tumor growth. *Cell Death Differ* 2020; 27: 1431–1446.
- 8 Xu YC, Gu Y, Yang JY, Xi K, Tang JC, Bian J, Cai F, Chen L. RACK1 mediates the advanced glycation end product-induced degradation of HIF-1 α in nucleus pulposus cells via competing with HSP90 for HIF-1 α binding. *Cell Biol Int* 2021; 45: 1316–1326.
- 9 Chen ZJ (陈子江). *Reproductive Endocrinology*. People's Medical Publishing House, 2016; 39 (in Chinese).
- 10 Du XY (杜秀雅), Ma HG. Research progress on the effect of angiogenesis-related factors on follicle growth and development. *Chin J Family Planning* (中国计划生育学杂志) 2014; 22(7): 502–504 (in Chinese).
- 11 Duncan WC, van den Driesche S, Fraser HM. Inhibition of vascular endothelial growth factor in the primate ovary up-regulates hypoxia-inducible factor-1 α in the follicle and corpus luteum. *Endocrinology* 2008; 149: 3313–3320.
- 12 Shimizu T, Iijima K, Miyabayashi K, Ogawa Y, Miyazaki H, Sasada H, Sato E. Effect of direct ovarian injection of vascular endothelial growth factor gene fragments on follicular development in immature female rats. *Reproduction* 2007; 134: 677–682.
- 13 He H, Zhang H, Pan Y, Zhang T, Yang S, Liu M, Robert N, Wang J, Zhao T, Zhao L, Fan J, Cui Y, Yu S. Low oxygen concentration improves yak oocyte maturation and inhibits apoptosis through HIF-1 and VEGF. *Reprod Domest Anim* 2022; 57: 381–392.

- 14 Guo J, Hu Z, Yan F, Lei S, Li T, Li X, Xu C, Sun B, Pan C, Chen L. *Angelica dahurica* promoted angiogenesis and accelerated wound healing in db/db mice via the HIF-1 α /PDGF- β signaling pathway. *Free Radic Biol Med* 2020; 160: 447–457.
- 15 Masoud GN, Li W. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B* 2015; 5: 378–89.
- 16 Nichols JA, Perego MC, Schütz LF, Hemple AM, Spicer LJ. Hormonal regulation of vascular endothelial growth factor A (VEGFA) gene expression in granulosa and theca cells of cattle. *J Anim Sci* 2019; 97: 3034–3045.
- 17 Li C, Liu Z, Li W, Zhang L, Zhou J, Sun M, Zhou J, Yao W, Zhang X, Wang H, Tao J, Shen M, Liu H. The FSH-HIF-1 α -VEGF pathway is critical for ovulation and oocyte health but not necessary for follicular growth in mice. *Endocrinology* 2020; 161(4): bqaa038.
- 18 Wang Z, Zhang Z, Wu Y, Chen L, Luo Q, Zhang J, Chen J, Luo Z, Huang X, Cheng Y. Effects of echinomycin on endothelin-2 expression and ovulation in immature rats primed with gonadotropins. *Exp Mol Med* 2012; 44: 615–621.
- 19 Szymanska M, Shrestha K, Girsh E, Harlev A, Eisenberg I, Imbar T, Meidan R. Reduced endothelin-2 and hypoxic signaling pathways in granulosa-lutein cells of PCOS women. *Int J Mol Sci* 2021; 22(15): 8216.
- 20 Papa Pde C, Sousa LM, Silva Rdos S, de Fátima LA, da Fonseca VU, do Amaral VC, Hoffmann B, Alves-Wagner AB, Machado UF, Kowalewski MP. Glucose transporter 1 expression accompanies hypoxia sensing in the cyclic canine corpus luteum. *Reproduction* 2014; 147: 81–89.
- 21 Woad KJ, Hunter MG, Mann GE, Laird M, Hammond AJ, Robinson RS. Fibroblast growth factor 2 is a key determinant of vascular sprouting during bovine luteal angiogenesis. *Reproduction* 2012; 143: 35–43.
- 22 Zhang X, Zhang W, Wang Z, Zheng N, Yuan F, Li B, Li X, Deng L, Lin M, Chen X, Zhang M. Enhanced glycolysis in granulosa cells promotes the activation of primordial follicles through mTOR signaling. *Cell Death Dis* 2022; 13: 87.
- 23 Harris SE, Leese HJ, Gosden RG, Picton HM. Pyruvate and oxygen consumption throughout the growth and development of murine oocytes. *Mol Reprod Dev* 2009; 76: 231–238.
- 24 Li C, Zhou J, Liu Z, Zhou J, Yao W, Tao J, Shen M, Liu H. FSH prevents porcine granulosa cells from hypoxia-induced apoptosis via activating mitophagy through the HIF-1 α -PINK1-Parkin pathway. *FASEB J* 2020; 34(3): 3631–3645.
- 25 Warzych E, Lipinska P. Energy metabolism of follicular environment during oocyte growth and maturation. *J Reprod Dev* 2020; 66: 1–7.
- 26 Schutt AK, Blesson CS, Hsu JW, Valdes CT, Gibbons WE, Jahoor F, Yallampalli C. Preovulatory exposure to a protein-restricted diet disrupts amino acid kinetics and alters mitochondrial structure and function in the rat oocyte and is partially rescued by folic acid. *Reprod Biol Endocrinol* 2019; 17(1): 12.
- 27 Zhou J, Yao W, Li C, Wu W, Li Q, Liu H. Administration of follicle-stimulating hormone induces autophagy via upregulation of HIF-1 α in mouse granulosa cells. *Cell Death Dis* 2017; 8: e3001.
- 28 Tang Z, Zhang Z, Tang Y, Qi L, Yang F, Wang Z. Effects of dimethyl carbonate-induced autophagic activation on follicular development in the mouse ovary. *Exp Ther Med* 2017; 14: 5981–5989.
- 29 Tang Z, Xu R, Zhang Z, Shi C, Zhang Y, Yang H, Lin Q, Liu Y, Lin F, Geng B, Wang Z. HIF-1 α protects granulosa cells from hypoxia-induced apoptosis during follicular development by inducing autophagy. *Front Cell Dev Biol* 2021; 9: 631016.
- 30 Fadhillah, Yoshioka S, Nishimura R, Yamamoto Y, Kimura K, Okuda K. Hypoxia-inducible factor 1 mediates hypoxia-enhanced synthesis of progesterone during luteinization of granulosa cells. *J Reprod Dev* 2017; 63: 75–85.
- 31 Tang Z, Zhang Z, Lin Q, Xu R, Chen J, Wang Y, Zhang Y, Tang Y, Shi C, Liu Y, Yang H, Wang Z. HIF-1 α /BNIP3-mediated autophagy contributes to the luteinization of granulosa cells during the formation of corpus luteum. *Front Cell Dev Biol* 2021; 8: 619924.
- 32 Zhang Y, Liu D, Hu H, Zhang P, Xie R, Cui W. HIF-1 α /BNIP3 signaling pathway-induced-autophagy plays protective role during myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biomed Pharmacother* 2019; 120: 109464.
- 33 Van Blerkom J, Antczak M, Schrader R. The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: association with vascular endothelial growth factor levels and perifollicular blood flow characteristics. *Hum Reprod* 1997; 12(5): 1047–1055.
- 34 Wang L, Tang J, Wang L, Tan F, Song H, Zhou J, Li F. Oxidative stress in oocyte aging and female reproduction. *J Cell Physiol* 2021; 236: 7966–7983.
- 35 Molinari E, Bar H, Pyle AM, Patrizio P. Transcriptome analysis of human cumulus cells reveals hypoxia as the main determinant of follicular senescence. *Mol Hum Reprod* 2016; 22(8): 866–876.
- 36 Yang Z, Hong W, Zheng K, Feng J, Hu C, Tan J, Zhong Z, Zheng Y. Chitosan oligosaccharides alleviate H₂O₂-stimulated granulosa cell damage via HIF-1 α signaling pathway. *Oxid Med Cell Longev* 2022; 2022: 4247042.
- 37 Endo T, Aten RF, Leykin L, Behrman HR. Hydrogen peroxide

- evokes antisteroidogenic and antigonadotropic actions in human granulosa luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76(2): 337–342.
- 38 Tang Z, Chen J, Zhang Z, Bi J, Xu R, Lin Q, Wang Z. HIF-1 α activation promotes luteolysis by enhancing ROS levels in the corpus luteum of pseudopregnant rats. *Oxid Med Cell Longev* 2021; 2021: 1764929.
 - 39 Zhou F, Song Y, Liu X, Zhang C, Li F, Hu R, Huang Y, Ma W, Song K, Zhang M. Si-Wu-Tang facilitates ovarian function through improving ovarian microenvironment and angiogenesis in a mouse model of premature ovarian failure. *J Ethnopharmacol* 2021; 280: 114431.
 - 40 Liu YH (刘亚华). Effects of kidney tonification and liver thinning on follicle rupture pathways regulated by follicle PR in *in vitro* cultured mice [D/OL]. Hebei Medical University (河北医科大学), 2018 (in Chinese). https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=Nk4cZQau9qFhgNOjACpwhf_8s-GLZK0O1gvd13O46CHukdYzrkvQ9KY2OXEq96hL-r3hyx0JGhdN8N-soJF1Wl8tYrrtUOJ9TS5vpsPckJJhhHH-q5ytVWP5A==&uniplatform=NZKPT&language=gb
 - 41 Xie Q (谢奇). Effect of chito-oligosaccharides in improving inflammation and oxidative stress in ovarian granule cells in patients with polycystic ovary syndrome [D/OL]. Nanchang University (南昌大学), 2021 (in Chinese). https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=Nk4cZQau9qE8gmN-HfjXTsQceaGaqJLDmoo5OptMsQh6KXfbC2jC5soB-wsNxtSrKqyUmrHVXo9jemhqtLUvbO4TQZ98_LMERYRhX3IqTpk3JGThSFiraGLg==&uniplatform=NZKPT&language=gb
 - 42 Zhu F, Gao J, Zeng F, Lai Y, Ruan X, Deng G. Hyperoside protects against cyclophosphamide induced ovarian damage and reduced fertility by suppressing HIF-1 α /BNIP3-mediated autophagy. *Biomed Pharmacother* 2022; 156: 113743.
 - 43 Cecchino GN, García-Velasco JA, Rial E. Reproductive senescence impairs the energy metabolism of human luteinized granulosa cells. *Reprod Biomed Online* 2021; 43(5): 779–787.
 - 44 Agani F, Jiang BH. Oxygen-independent regulation of HIF-1: novel involvement of PI3K/AKT/mTOR pathway in cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2013; 13(3): 245–251.
 - 45 Zou X, Zhang L, Yuan J, Yang C, Wu Z, Song J, Zhu W, Mao Y, Chen L. Endogenous hormone 2-methoxyestradiol suppresses venous hypertension-induced angiogenesis through up- and down-regulating p53 and id-1. *J Cell Mol Med* 2018; 22: 957–967.
 - 46 Yang DX (杨东霞), Shen RX, Li HM, Huo YX, Yang XM. Research progress of microRNAs in the pathogenesis of polycystic ovary syndrome. *Chin J Reprod Health* (中国生育健康杂志) 2022; 33(1): 81–83, 89 (in Chinese).
 - 47 Song CM (宋翠淼), Duan YC, He M, Xu HZ, Du HL. Effects of kidney tonifying formula and Xiaoyao pill on HIF-1 α and EDN2, key factors of ovulation in gonadotropin pretreated mice. *Chin J Trad Chin Med* (中华中医药杂志) 2020; 35(4): 1714–1718 (in Chinese).