一氧化氮在雌性生殖系统中的作用

张 璇 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)

一氧化氮(nitric oxide, NO)是脊椎动物体内普遍存在的效应分子和细胞间信息分子. NO 由一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)催化 L-精氨酸和氧生成. 现已确定的 NOS 亚型有 3 种: 神经型 NOS (neuronal NOS, nNOS)、诱导型 NOS (inducible NOS, iNOS)和内皮型 NOS(endothelial NOS, eNOS). nNOS 和 eNOS 在生理状况下即有表达, 又称为结构型 NOS(constitutive NOS, cNOS). cNOS 活性的发挥需要钙离子参与, 又称为钙离子依赖性 NOS. iNOS 基因在生理情况下一般不表达, 仅在一些诱导剂, 如免疫刺激因子的作用下表达, 其活性发挥不依赖于钙离子[1].

NO 在生物体内具有重要的生理作用, 它是一种强有力的内源性平滑肌舒张剂和血管扩张剂. NO 通过激活鸟苷酸环化酶(GC), 导致细胞内环鸟苷酸(cGMP)浓度升高, 从而发挥信号传导的功能, 引发一系列反应[2]. 近年来研究表明, NO 参与血流调节、血栓形成、神经传导以及巨噬细胞的毒性作用[3]. 在生殖系统中 NO 参与精子获能、卵巢排卵、胚胎植入和妊娠维持等多种重要的生殖过程[4~7]. 目前对于 NO 的研究已经渗入到众多学科, 成为生物医学领域研究的热点和前沿之一.

1 NO 与信号通路

NO 是 GC 的重要激活物, GC 催化鸟苷三磷酸(GTP)生成 cGMP. cGMP 广泛存在于生物体内, 在脊椎动物体内通过磷酸二酯酶对 cGMP 的调控, 及蛋白激酶(GPK)对细胞蛋白质的磷酸化作用来介导 cGMP 在细胞中的多种生理效应, 如血管平滑肌舒张、增加多核白细胞趋化性和触发神经元冲动发放等[8]. 现在普遍认为, NO 可作为 GC 激活物与 GC, cGMP 共同构成第二信使系统. NO-cGMP 系统在人和动物的多种组织和细胞中广泛存在, 它代表了一种细胞间和细胞内信息传递和细胞功能调节的新信号传导系统.

2 NO 在雌性生殖系统中的作用

NO 作为一种多功能分子, 在许多生理系统的信号传导中起重要作用. 目前已知生殖器官分泌的 NO 可参与卵巢功能的正常发挥、胚胎植入、妊娠维持及分娩等生殖事件[5~7].

2.1 NO 在卵巢中的作用

研究表明, 卵巢中存在着 NO 产生系统, 它是一种重要的卵巢功能调节因子. NO 参与卵巢中卵泡发育、成熟、排卵以及黄体溶解过程[5,9,10].

卵泡膜细胞和颗粒细胞中有 eNOS 蛋白表达, 在卵泡和已排出的卵母细胞中也存在 eNOS 的特异性表达. NO 代谢产物硝酸盐/亚硝酸盐在体内循环系统中的含量随着卵泡发育进程而增加, 而且其含量与卵泡发育程度具有正相关关系, 说明卵巢中产生的 NO 对卵泡发育具有重要作用. eNOS 基因敲除研究表明, 基因敲除小鼠的卵泡和卵母细胞发育出现缺陷, 表现为生长卵泡数量减少、排出的卵母细胞减数分裂成熟异常, 只有极少数卵母细胞发育至第二次减数分裂中期, 卵母细胞的死亡率较高[9]. 这些研究结果说明, 由 eNOS 催化产生的 NO 是卵母细胞减数分裂成熟的主要调节因子, NO 在卵母细胞成熟、发育及卵泡成熟过程中发挥重要作用[11].

据 Shukovski 等人[5]报道, 在体情况下使用 NOS 抑制剂可以抑制人绒毛膜促性腺激素(hCG)诱导的大鼠卵巢排卵过程, 而 NO 供体可以逆转这种抑制作用, 说明 NO 参与卵巢排卵过程. eNOS 基因敲除小鼠排卵率明显降低, 仅为正常小鼠排卵率的 50%, 而且卵巢中新形成的黄体数(相当于卵巢的排卵数)较正常小鼠少[9]. 这些研究结果说明在小鼠排卵过程中 NO 有重要作用. 进一步研究发现, iNOS 亚型是排卵过程的主要参与者, 它催化产生的 NO 通过促进前列腺素 E (prostaglandin E, PGE)和前列腺素 F (prostaglandin F, PGF)合成的增加, 从而刺激卵泡破裂及促进卵巢排卵[12].

在人黄体的晚黄体期 eNOS 有高度表达, 在有 NO 供体存在的情况下, 晚黄体期细胞孕酮的分泌明显降低; 而中期和黄体期细胞孕酮生成没有明显变化. 在晚黄体期细胞中, NO 可明显促进 PGE 产生, 而 PGE 是一种重要的溶黄体因子(luteolytic factor). 以

上研究表明 NO 在黄体溶解中发挥重要的作用[10].

2.2 NO 在月经/动情周期中的作用

NOS 存在于许多动物的子宫内膜中. 人子宫内膜腺上皮和腔上皮细胞都有 eNOS 表达, 并在分泌中期达到表达高峰[13], 而 iNOS mRNA 只在分泌期子宫的腺上皮细胞中有高表达. 由于分泌期子宫内膜细胞可以产生大量的细胞因子: 如肿瘤坏死因子(tumour necrosis factor, TNF), 白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)和转化生长因子-β1 (transforming growth factor-β1, TGF-β1)等, 这些细胞因子可诱导子宫 iNOS 表达的增加, 因而使分泌期 NO 产生升高. 研究表明, 分泌期产生的 NO 参与了月经发生及月经出血的调控[2,14]. 子宫平滑肌的收缩性对于经血排出有重要作用, 行经过程中子宫和血管平滑肌的收缩受 NO-cGMP 通路的调控[15]. 由以上研究结果可以看出, NO 参与了月经周期中月经的发生、月经出血的控制及经血排出等过程.

在大鼠的动情周期子宫中, iNOS 分布于腺上皮及肌层平滑肌细胞, 并在动情前期和动情期有高表达, 表明 NO 与子宫内膜正常生理功能的发挥有关[16]. 此外, NO 还参与小鼠动情周期的调控. eNOS 基因敲除研究表明, 基因敲除小鼠的动情周期发生紊乱, 表现为 eNOS 基因敲除小鼠的动情周期延长至 6~7 d (正常周期为 4~5 d)[9], 说明 NO 对于维持小鼠的正常动情周期具有重要作用.

2.3 NO 与胚胎植入

哺乳动物的胚胎植入发生于排卵后的特定时期, 在这个过程中, 母体子宫植入“窗口”的起闭及胚胎对子宫内膜的侵蚀作用对成功植入极其重要. 研究表明, NO 在胚胎植入中发挥了重要作用[6,17,18].

为证明在胚胎植入时期有 NO 产生, Purcell 等人[17]采用免疫组织化学和蛋白印迹方法对围植入期小鼠子宫中 iNOS 和 eNOS 的表达进行了分析, 研究发现, 与非植入位点相比, 植入位点 iNOS 和 eNOS 的表达都升高. 这些结果初步表明, NO 对成功植入具有重要作用.

与 NO 相关药理性工具药的使用为进一步阐明 NO 在胚胎植入中的作用机理提供了有力手段. 对妊娠大鼠一侧子宫角注射 NOS 竞争性抑制剂 N-硝基-L-精氨酸甲酯(N-nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME), 发现胚胎植入率减少了 50%, 同时子宫内膜的容受性和胚胎的发育状况也受到很大影响; 另外 L-NAME 对胚胎植入的抑制作用可被 NO 的供体硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)所抵消[6], 说明 L-NAME 是通过抑制 NO 的产生而使胚胎植入受到影响. Ota 等人[18]在研究 NO 对胚胎植入的作用时发现, NO 产生的抑制可使基质细胞的蜕膜化延迟并造成前蜕膜细胞的功能产生缺陷, 从而使胚胎植入受到抑制. 以上研究表明, 子宫蜕膜组织表达 NOS, 并且在围植入期子宫植入区域 NOS 的表达及活性均增加, 说明围植入期产生的 NO 参与了胚胎植入过程.

胚胎植入过程中发生的一个重要变化是子宫血管增生和通透性的增加. 虽然有形态学和解剖学证据表明, 血管发生(angiogenesis)和雌性生殖系统的功能状态具有密切的关系, 但对于血管发生的机制却了解很少; 而 NO 作为一种内源性的血管舒张因子, 具有强大的舒张血管和促血管生成作用, 因此, NO 可能通过这种机制在植入过程中发挥作用.

已有研究表明, 在妊娠大鼠子宫中, iNOS 分布于蜕膜内血管的周围, 同时还表达在外胎盘锥中; 而 eNOS 集中分布于靠近胚胎的初级蜕膜血管中[17]. 说明 NO 可能通过调节胚胎植入位点的血管发生而参与胚胎植入. 在雌激素影响下, 妊娠大鼠体内可产生几种血管舒张物质, 如乙酰胆碱(acetylcholine, Ach)、组胺(histamine)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等[19], 这些物质可能对内源性 NO 的产生起调节作用[20]. 据 Van der Zee 等人[21]的体外研究报道, VEGF 可以调节血管生成及诱导内皮细胞 NO 产生, 在 VEGF 对毛细血管通透性的调节通路中包含有 NO 合成[21].

在 VEGF 对血管发生和内皮细胞功能的调节中, NO 的产生起重要作用. 在内皮细胞中 VEGF 通过其受体 KDR 的作用实现对 NOS 表达的上调; 另外 VEGF 还通过对酪氨酸激酶的激活诱导 eNOS 表达, 进而诱导血管发生[22,23]. 体外研究还发现 NOS 表达的增强可以增加 VEGF 产生[24]. Murohara 等人[25]利用 eNOS 基因敲除小鼠的研究表明, 小鼠体内血管发生的缺陷并不能通过增加外源的 VEGF 得到改善, 说明 eNOS 是一种处于 VEGF 下游的血管发生调节因子. 以上研究表明, NO 可以通过参与 VEGF 对血管发生过程的调节而参与胚胎成功植入和雌性生殖功能的正常发挥.

2.4 NO 在妊娠及分娩中的作用

妊娠过程与体内孕酮和雌激素水平密切相关. 雌激素作用于子宫内膜, 使内膜产生特征性的、胚胎植入必需的敏感性变化, 其中包括血管通透性增加和基质水肿等植入早期反应. 雌激素对子宫作用的发挥需要 NO 的产生[26], 同时妊娠过程中子宫内膜 NO 的产生受到雌孕激素的调节[27].

NO 可调节子宫平滑肌细胞的收缩性及自发性收缩, 对妊娠过程中子宫的持续扩张起调节作用[28]. NO 还可影响妊娠过程中母胎血液循环中血流调节、外围血管的扩张及维持子宫肌层静止(myometrial quiescence)[7]. 有研究报道, 内源性 NO 可抑制大鼠妊娠时期子宫肌层连接蛋白 43 (Cx43)的表达, 而 Cx43 是分娩过程中的一种重要因子, 它可以抑制子宫壁舒张, 并使子宫壁的延伸性增加. 这些研究结果提示 NO 可以通过抑制分娩必需基因的表达来调节妊娠维持过程.

分娩时伴随着子宫颈成熟过程, 在这个类似炎症反应的过程中, 子宫颈的细胞外基质发生重组, 子宫颈的结构由致密变得柔软, 为顺利分娩创造条件. 但对于这种现象发生的原因及具体调控机制还了解甚少. 对人和其他一些动物模型的研究发现, NO 对于子宫颈成熟过程具有重要的作用. 妊娠大鼠子宫颈中存在 3 种 NOS 亚型的表达; 大鼠正常子宫颈成熟过程中, NO 的局部释放量增高, 并伴随着 iNOS mRNA 的表达增加[7]. Tschugguel 等人[29]发现, 人正常分娩后, 子宫颈中 iNOS 的表达及活性均增加. NO 可能通过诱导基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)的合成[30]促使成熟子宫颈细胞外基质降解; 另外, NO 与炎症反应和细胞凋亡有密切关系, 而这两种生理过程与子宫颈成熟密切相关, NO 可能通过参与对炎症反应和细胞凋亡的调节而参与了对子宫颈成熟的调控[31], 但对于 NO 在子宫颈成熟和分娩中的具体调控机制还需进一步的研究.

NOS 3 种不同亚型在妊娠中所起的作用明显不同. Farina 等人[32]对大鼠妊娠早期、中期和晚期子宫中 NO 的产生情况进行了比较, 发现在动情期、妊娠不同时期和分娩后的子宫中均有 NO 合成, 并且 iNOS 是催化合成 NO 的主要酶. 在妊娠过程中不同亚型 NOS 的表达也不同, nNOS 在前述的各时期子宫中均无表达; 而 eNOS 存在于上述各个时期, 并在妊娠第 13 天时表达显著升高, 分娩之后表达降到最低. iNOS 在整个妊娠时期呈现平稳的上升表达, 在足月妊娠和分娩后的子宫中 iNOS 的表达下降.

3 NO 的研究与应用展望

NO 作为一种信息分子, 最初因为它对血管的作用而受到重视. 近来大量研究表明, NO 不仅在血管发生过程中起重要作用[33], 而且和生殖功能的正常发挥有密切关系; 研究发现, 血管发生和雌性生殖过程具有密切联系[34], 从而扩大了 NO 在雌性生殖系统中的研究范围.

在 NO 参与的血管发生调节过程中, NO 除了和 VEGF 具有相互调控关系外, 还与其他多种分子构成复杂的调控网络. 最近研究发现, eNOS 所发挥的促血管形成作用还可以通过丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 Akt 依赖的方式实现[35], Akt 通过钙离子非依赖性方式调节 eNOS 活化[36]. 另有研究表明, 整合素(integrin)和 TGF-β 对于 NO 生血管的发挥具有重要作用[37,38]. Chiarugi 等人[39]的研究发现, 诱导型环氧化酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2)可通过催化生成 PGE 而诱导多种生血管因子的产生, 如 VEGF, 碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF), TGF-β, 血小板源性生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)和 iNOS; 此外 p53 可以通过多种途径实现对血管发生的抑制作用, 如促进抗血管因子的产生、抑制 VEGF 和 iNOS 等生血管因子的分泌以及诱导细胞凋亡等. 另外在人类癌转移和血管发生中, iNOS 也具有重要作用. 在体的研究发现, 野生型 p53 蛋白可通过下调 iNOS 的表达而抑制肿瘤生长[40].

从以上研究结果可以看出, NO 在血管发生过程中具有重要的作用, 而且在血管发生过程中与 NO 有关的一些细胞因子如 VEGF, TGF-β 和整合素等在生殖系统也具有重要作用. 雌性生殖系统中各种生殖功能的正常发挥需要各种因子之间的协调作用, 要深入了解 NO 在雌性生殖系统中的作用机理, 就要在分子水平上从各种细胞因子之间相互作用的角度, 深入研究 NO 和其他细胞因子之间的关系, 这将使我们更全面地了解 NO 在雌性生殖系统中的作用.

在临床方面应用的避孕类药物就是通过阻断生殖过程的一个或者多个环节以达到避孕目的. 前述研究表明, NO 可参与如卵泡发育、排卵、胚胎植入和妊娠维持等多种雌性生殖过程. 如在其中的任何一个环节抑制 NO 的产生, 将会使卵巢排卵功能以及妊娠过程的正常进行受到影响. 另有研究发现, 对围

着床期大鼠施用NOS抑制剂可使妊娠率减少50%[15]. 这些研究结果为抗 NO 产生作为避孕途径提供了理论基础.

生殖领域中有许多的未解之谜. 有关NO对雌性生殖系统作用的研究还处于初步阶段, 结合NO在血管发生中的作用, 进一步探讨雌性生殖过程中NO和其他细胞因子之间的调控关系, 可能为阐明生殖机理提供新思路.

致谢 本工作为国家重点基础研究发展规划资助项目(批准号: G1999055903)和中国科学院创新工程基金资助项目.

参 考 文 献

1 Knowles R G, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. Biochem J, 1994, 298: 249~258

2 Cameron I T, Campbell S. Nitric oxide in the endometrium. Hum Reprod Update, 1998, 4: 565~569

3 Beckman J S, Koppenol W H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. Am J Physiol, 1996, 271: 1424~1437

4 O'Bryan M K, Zini A, Cheng C Y, et al. Human sperm endothelial nitric oxide synthase expression: correlation with sperm motility. Fertil Steril, 1998, 70: 1143~1147

5 Shukovski L, Tsafriri A. The involvement of nitric oxide in the ovulatory process in the rat. Endocrinology, 1994, 135: 2287~2290

6 Biswas S, Kabir S N, Pal A K. The role of nitric oxide in the process of implantation in rats. J Reprod Fertil, 1998, 114: 157~161

7 Ali M, Buhimschi I, Chwalisz K, et al. Changes in expression of the nitric oxide synthase isoforms in rat uterus and cervix during pregnancy and parturition. Mol Hum Reprod, 1997, 3: 995~1003

8 Schmidt H H, Lohmann S M, Walter U. The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. Biochim Biophys Acta, 1993, 1178: 153~175

9 Jablonka-Shariff A, Ravi S, Beltsos N A, et al. Abnormal estrous cyclicity after disruption of endothelial and inducible nitric oxide synthase in mice. Biol Reprod, 1999, 61: 171~177

10 Friden B E, Runesson E, Hahlin M, et al. Evidence for nitric oxide acting as a luteolytic factor in the human corpus luteum. Mol Hum Reprod, 2000, 6: 397~403

11 Jablonka-Shariff A, Olson L M. Nitric oxide is essential for optimal meiotic maturation of murine cumulus-oocyte complexes in vitro. Mol Reprod Dev, 2000, 55: 412~421

12 Faletti A, Perez M S, Perotti C, et al. Activity of ovarian nitric oxide synthase (NOs) during ovulatory process in the rat: relationship with prostaglandins (PGs) production. Nitric Oxide, 1999, 3: 340~347

13 Ota H, Igarashi S, Hatazawa J, et al. Endothelial nitric oxide synthase in the endometrium during the menstrual cycle in patients with endometriosis and adenomyosis. Fertil Steril, 1998, 69: 303~308

14 Tschugguel W, Schneeberger C, Unfried G, et al. Induction of inducible nitric oxide synthase expression in human secretory endometrium. Hum Reprod, 1998, 13: 436~444

15 Cornwell T L, Li J, Sellak H, et al. Regulation of cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase in human uterine tissues during the menstrual cycle. Biol Reprod, 2001, 64: 857~864

16 Chatterjee S, Gangula P R, Dong Y L, et al. Immunocytochemical localization of nitric oxide synthase-Ⅲ in reproductive organs of female rats during the oestrous cycle. Histochem J, 1996, 28: 715~723

17 Purcell T L, Given R, Chwalisz K, et al. Nitric oxide synthase distribution during implantation in the mouse. Mol Hum Reprod, 1999, 5: 467~475

18 Ota H, Igarashi S, Oyama N, et al. Optimal levels of nitric oxide are crucial for implantation in mice. Reprod Fertil Dev, 1999, 11: 183~188

19 Cullinan-Bove K, Koos R D. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in the rat uterus: rapid stimulation by estrogen correlates with estrogen-induced increases in uterine capillary permeability and growth. Endocrinology, 1993, 133: 829~837

20 Jovanovic A, Grbovic L, Tulic I. Predominant role for nitric oxide in the relaxation induced by acetylcholine in human uterine artery. Hum Reprod, 1994, 9: 387~393

21 van der Zee R, Murohara T, Luo Z, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor augments nitric oxide release from quiescent rabbit and human vascular endothelium. Circulation, 1997, 95: 1030~1037

22 Kroll J, Waltenberger J. A novel function of VEGF receptor-2(KDR): rapid release of nitric oxide in response to VEGF-A stimulation in endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 265: 636~639

23 Bouloumie A, Schini-Kerth V B, Busse R. Vascular endothelial growth factor up-regulates nitric oxide synthase expression in endothelial cells. Cardiovasc Res, 1999, 41: 773~780

24 Dulak J, Jozkowicz A, Dembinska-Kiec A. Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000, 20: 659~666

25 Murohara T, Asahara T, Sliver M, et al. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. J Clin Invest, 1998, 101: 2567~2578

26 Van Buren G A, Yang D S, Clark K E. Estrogen-induced uterine vasodilatation and antagonized by L-nitroarginine methyl ester, an inhibitor of nitric oxide synthesis. Am J Obstet Gynecol, 1992, 167: 828~833

27 Yallampalli C, Dong Y L. Estradiol-17beta inhibits nitric oxide synthase (NOS)-Ⅱ and stimulates NOS-Ⅲ gene expression in the rat uterus. Biol Reprod, 2000, 63: 34~41

28 Izumi H, Garfield R E. Relaxant effects of nitric oxide and cyclic GMP on pregnant rat uterine longitudinal smooth muscle. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 1995, 60: 171~180

29 Tschugguel W, Schneeberger C, Lass H. Human cervical ripening is associated with an increase in cervical inducible nitric oxide synthase expression. Biol Reprod, 1999, 60: 1367~1372

30 Trachtman H, Futterweit S, Singhal P. Nitric oxide modulates the synthesis of extracellular matrix proteins in cultured rat mesangial cells. Biochem Biophys Res Commun, 1995, 207: 120~125

31 Osmers R G, Adelmann-Grill B C, Rath W, et al. Biochemical events in cervical ripening dilatation during pregnancy and parturition. J Obstet Gynaecol, 1995, 21: 185~194

32 Farina M, Ribeiro M L, Franchi A. Nitric oxide synthase in pregnant rat uterus. Reproduction, 2001, 121: 403~407

33 Jadeski L C, Lala P K. Nitric oxide synthase inhibition by N(G)-nitro-L-arginine methyl ester inhibits tumor-induced angiogenesis in mammary tumors. Am J Pathol, 1999, 155: 1381~1390

34 邵龙江, 祝诚. 雌性生殖系统中的血管生成. 科学通报, 2001, 46: 355~358

35 Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, et al. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. Nature, 1999, 399: 601~605

36 Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, et al. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. Nat Med, 2000, 6: 1004~1010

37 Murohara T, Witzenbichler B, Spyridopoulos I, et al. Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999, 19: 1156~1161

38 Krupinski J, Vodovotz Y, Li C, et al. Inducible nitric oxide production and expression of transforming growth factor-beta 1 in serum and CSF after cerebral ischaemic stroke in man. Nitric Oxide, 1998, 2: 442~453

39 Chiarugi V, Magnelli L, Gallo O. Cox-2, iNOS and p53 as play-makers of tumor angiogenesis. Int J Mol Med, 1998, 2: 715~719

40 Brennan P A, Palacios-Callender M, Umar T, et al. Correlation between type Ⅱ nitric oxide synthase and p53 expression in oral squamous cell carcinoma. Br J Oral Maxillofac Surg, 2000: 38: 627~632

(2002-02-01 收稿, 2002-03-21 收修改稿)