

## 研究论文

# Hippo信号通路主要分子与卵巢生殖干细胞相关因子在人和小鼠卵巢衰退过程中的表达相关

徐娇<sup>2</sup>, 曹秀萍<sup>3</sup>, 唐子娟<sup>4</sup>, 黄健<sup>1</sup>, 郑月慧<sup>3,5</sup>, 李佳<sup>1,5,\*</sup>

南昌大学医学院<sup>1</sup>医学实验教学中心; <sup>2</sup>第一临床医学院; <sup>3</sup>基础医学院; <sup>4</sup>护理学院; <sup>5</sup>江西省生殖生理与病理重点实验室, 南昌 330006

**摘要:** 本研究旨在探讨Hippo信号通路的主要分子与卵巢生殖干细胞(ovarian germline stem cell, OGSC)相关因子在人和小鼠衰老不同功能状态卵巢中表达的相关性。选择2月龄性成熟期(正常对照)、12月龄衰老期(生理性衰退) KM系小鼠卵巢, 以及青年期(青春期后~35岁)、中年期(36~50岁)和绝经期(51~60岁)女性卵巢皮层样本; 采用环磷酰胺/马利兰片(cyclophosphamide/busulfan, CY/BUS)腹腔注射方式构建小鼠病理性衰退卵巢模型, 用HE染色法检测各级卵泡的变化, 用免疫组织化学法和免疫荧光染色法检测Hippo信号分子与OGSC相关因子(MVH/OCT4)的定位和表达变化, 用Western blot检测Hippo信号通路的主要分子和OGSC相关因子的蛋白表达水平。结果显示, 在生理性和病理性衰退模型小鼠卵巢中已无正常卵泡, 仅有一些闭锁卵泡存在; 和正常对照小鼠相比, 生理性和病理性衰退模型小鼠卵巢皮层Hippo信号通路的主要分子(pYAP1)和MVH/OCT4蛋白表达水平均显著降低, 病理性衰退模型小鼠卵巢皮层pYAP1/YAP1比值升高。和青年期女性相比, 中年期和绝经期女性卵巢表面上皮(ovarian surface epithelium, OSE)结构逐渐变得松散, 皮层处细胞也逐渐减少; LATS2蛋白表达水平在青年期女性OSE最高, MST1蛋白表达水平在老年期女性OSE最低, 而YAP1和pYAP1蛋白表达水平在中年期女性OSE最高; 相比青年期女性, 中年期和老年期OSE的pYAP1/YAP1比值显著降低, 而二者之间无显著性差异。青年期女性OSE中MVH蛋白表达水平显著高于中年期和老年期。以上结果表明, Hippo信号通路的主要分子与OGSC相关因子的蛋白表达之间有相关性, 提示Hippo信号通路可能调控OGSC相关因子表达, 从而参与卵巢功能的生理性衰退和病理性衰退过程。

**关键词:** 功能状态卵巢; 卵巢衰退模型; 卵巢生殖干细胞; Hippo通路

**中图分类号:** Q291

## Expression relationship of Hippo signaling molecules and ovarian germline stem cell markers in the ovarian aging process of women and mice

XU Jiao<sup>2</sup>, CAO Xiu-Ping<sup>3</sup>, TANG Zi-Juan<sup>4</sup>, HUANG Jian<sup>1</sup>, ZHENG Yue-Hui<sup>3,5</sup>, LI Jia<sup>1,5,\*</sup>

<sup>1</sup>Medical Laboratory Education Center; <sup>2</sup>The First Clinical Medical School; <sup>3</sup>School of Basic Medical Sciences; <sup>4</sup>Nursing School; <sup>5</sup>The Key Laboratory of Reproductive Physiology and Pathology of Jiangxi Province, College of Medicine, Nanchang University, Nanchang 330006, China

**Abstract:** The present study was aimed to investigate the expression relationship of Hippo signaling molecules and ovarian germline stem cell (OGSC) markers in the development schedule of OGSCs during ovarian aging in women and mice. The ovaries of 2-month-old mature (normal control) and 12-month-old (physiological ovarian aging) KM mice were sampled, and the ovarian cortex samples of young (postpuberty to 35 years old), middle age (36–50 years old) and menopausal period (51–60 years old) women were obtained with consent. The mice model of pathological ovarian aging was established by intraperitoneal injection of cyclophosphamide/busulfan

Received 2018-06-20 Accepted 2018-10-24

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81671455, 81771583), the Natural Science Foundation of Jiangxi Province, China (No. 20152ACB20023), and the Young Teachers Research and Training Foundation of Nanchang University (No. PY201814).

\*Corresponding author. E-mail: lijia4199@163.com

(CY/BUS). HE staining was used to detect the changes of follicles at different stages, and the localization and expression changes of Hippo signaling molecules and OGSCs related factors (MVH/OCT4) were detected by immunohistochemistry and immunofluorescence staining. Western blot was used to detect the protein expression levels of the major molecules in the Hippo signaling pathway and OGSCs related factors. The results showed that there were not any normal follicles, but a few atresia follicles in the ovaries from physiological and pathological ovarian aging mice. Compared with the normal control mice, both the physiological and pathological ovarian aging mice showed decreased protein expression levels of the main Hippo signaling molecules (pYAP1) and MVH/OCT4; Whereas only the pathological ovarian aging mice showed increased ratio of pYAP1/YAP1. In comparison with the young women, the middle age and menopausal women showed looser structure of ovarian surface epithelium (OSE) and less ovarian cortical cells. The protein expression level of LATS2 in the OSE was the highest in young women, MST1 expression was the lowest in the menopausal period women, and the expression levels of YAP1 and pYAP1 were the highest in middle age women. Compared with the young women, the middle age and menopausal period women exhibited significantly decreased ratio of OSE pYAP1/YAP1, whereas there was no significant difference between them. The expression level of MVH protein in OSE from the young women was significantly higher than those of the middle age and menopausal period women. These results indicate that there is an expression relationship between the main molecules of Hippo signaling pathway and OGSCs related factors, which suggests that Hippo signaling pathway may regulate the expression levels of OGSCs related factors, thus participating in the process of physiological and pathological degeneration of ovarian.

**Key words:** functional ovarian; ovarian aging model; ovarian germline stem cells; Hippo signaling pathway

卵巢衰退包括卵巢自然衰退 ( 也称作生理性衰退 ) 和病理性卵巢衰退 (premature ovarian failure, 也称作卵巢早衰)<sup>[1]</sup>。目前, 病理性卵巢衰退主要是指女性在 40 岁前出现卵巢功能衰竭, 伴有雌激素水平低下、继发性闭经或绝经、不孕等症状<sup>[2, 3]</sup>。目前, 卵巢早衰可导致女性不孕不育, 雌激素水平分泌不足, 且严重影响女性身心健康, 但由于卵巢早衰为典型的异质性疾病, 主要采用激素替代疗法来治疗, 临床上仍没有明确有效的治疗方法来恢复或保护卵巢功能<sup>[4-6]</sup>。

Hippo 信号通路最初发现于果蝇和哺乳动物体内, 该通路可调控器官体积、保持细胞增殖和凋亡的平衡、维持内环境稳定; 参与细胞接触性抑制调节; 作为抑癌基因调节上游分子与核心分子, 参与多种肿瘤发生, 如肝癌、胃癌及卵巢癌等<sup>[7-9]</sup>。结构较为完整的 Hippo 通路主要包含以下组分: (1) 上游调节因子, 如含有 FERM 结构域的蛋白 EX (Expanded) 和 MER (Merlin) 等; (2) 核心因子, 包括 MST1/2 (mammalian STE20-like protein kinase, 果蝇同源物为 Hippo)、LATS1/2 (large tumor suppressor 1/2, 果蝇同源物为 Wts)、SAV1 (human salvador homology 1) 和 MOB (MOB kinase activator); (3) 主要效应因子 YAP (Yes-associated protein, 果蝇同源物为 Yki)。其中核心因子为核心激酶链, 上游调节因子与核心因子分属于抑癌基因, 主要效应因子则为候选癌基因<sup>[10, 11]</sup>。

2004 年, Johnson 等<sup>[12]</sup>首次提出卵巢中存在生

殖干细胞。目前, 已有大量文献报道了卵巢生殖干细胞 (ovarian germinal stem cells, OGSCs) 的生物学特性, 并证实了出生后的小鼠卵巢中存在卵母细胞和卵泡的更新<sup>[13-16]</sup>。本课题组也已成功分离、培养了新生小鼠卵巢干细胞<sup>[17]</sup>。OGSCs 存在于卵巢表面上皮 (ovarian surface epithelium, OSE) 中, 在光镜下呈圆形, 直径约 15~20  $\mu\text{m}$ , 数目稀少, 经传代增殖后可见成串或成簇存在, 表达 MVH (mouse vasa homolog, 从生殖干细胞开始分化至减数分裂后期配子产生的生殖细胞特异性基因)、OCT4 [POU (Pit-Oct-Unc) 转录因子家族成员, 为一种生殖干细胞特异性的转录因子] 等多种生殖细胞和干细胞标志物。Patel 等<sup>[18]</sup>证实成年绵羊 OSE 中存在可表达 OCT4、SSEA 等干性细胞标记因子及增殖能力因子 [如增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA)] 的一类干性细胞。这些研究发现都进一步证实了 OGSCs 的存在, 将为卵巢早衰和不孕症的防治提供新的思路方法和新的靶点, 为卵巢衰竭患者带来了新的希望。

研究显示, 在果蝇卵子发生过程中, 卵室形状的改变引起的细胞间粘附和张力的改变可激活细胞 Hippo 通路<sup>[19, 20]</sup>。Woodruff 等<sup>[21]</sup>研究显示, 高密度的卵巢表皮层可使原始卵泡维持于静息状态, Hippo 信号通路可能参与调控这一生理现象。Zhang 等<sup>[22]</sup>的研究显示, 哺乳动物卵巢表达 Hippo 通路的下游信号分子——YAP。该研究利用基因芯片技术筛选小鼠原始卵泡启动前后的差异性表达原癌基

因, 结果显示, 随着原始卵泡的启动生长, YAP 表达明显上调, 且原位杂交结果显示 YAP 在卵巢皮髓交界处的表达明显强于卵巢皮层内<sup>[22]</sup>。本研究组前期研究显示, Hippo 信号通路的主要效应因子 (LATS2、MST1 和 YAP1) 能触发原始卵泡的启动<sup>[23]</sup>, 表明 Hippo 信号通路在调控 OGSCs 功能中具有重要作用。根据上述研究基础, 我们推测 Hippo 信号通路可能在卵巢功能生理性和病理性衰退过程中也参与调控 OGSCs 的增殖和分化。目前关于 Hippo 通路与在不同衰退卵巢小鼠模型中 OGSCs 相关因子的表达变化之间关系尚不明了。因此, 本文利用环磷酰胺 / 马利兰片 (cyclophosphamide/busulfan, CY/BUS) 构建经典病理性卵巢衰退动物模型<sup>[24]</sup>, 采用免疫组织化学法和 Western blot 检测 Hippo 信号分子及 OGSCs 相关因子的动态表达变化, 以期深入理解 OGSCs 的生物学功能及卵巢衰老机制。

## 1 材料与方 法

**1.1 实验动物及模型建立** 实验动物: 2 月龄健康雌性 KM 系小鼠, 90 只, 体重约 25 g, 购自南昌大学医学院医学实验动物科学中心。所有动物饲养、护理均按照实验动物护理和使用指南 (National Research Council Guide for Care and Use of Laboratory Animals) 进行。所有有关动物使用、动物实验操作均获得南昌大学动物科学中心伦理委员会批准, 并遵循实验动物管理与使用委员会 (Institutional Animal Care and Use Committee) 规范。

**1.2 主要试剂及仪器** 主要试剂: BUS 和 CY 购自 Sigma 公司; 兔抗 GAPDH (ab37168)、小鼠抗 YAP1 (ab56701)、兔抗 MST1 (ab51134)、小鼠抗 LATS2 (ab57043)、兔抗 OCT4 (ab18976)、小鼠抗 MVH (ab27591) 及兔抗 pYAP1 (ab76252) 抗体均购自 Abcam 公司; 山羊抗兔二抗 (SA00001-2, SA00003-2) 及山羊抗小鼠二抗 (SA00001-1, SA00003-1) 均购自 Proteintech 公司。RIPA 裂解液和 BCA 蛋白浓度

测定试剂盒购自碧云天生物技术有限公司; PVDF 膜购自 Millipore 公司; ECL 发光液购自 Thermo 公司。

主要仪器: 病理切片机 (德国 Leica 公司)、高速低温冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司)、光学显微镜 (日本 Olympus 公司)、SDS 凝胶电泳系统 (美国 Bio-Rad 公司)、组织摊烤片机 (武汉俊杰公司)、转膜系统 (美国 Bio-Rad 公司)、超低温冰箱 (美国 Thermo 公司)、高压灭菌器 (美国 Thermo 公司)、超纯水仪 (美国 Millipore 公司)。

**1.3 动物分组与模型建立** 分组如下: 正常对照组 (control): 2 月龄健康雌性 KM 系小鼠。每组各 30 只小鼠; 生理性衰退模型小鼠组 (12M): 2 月龄健康雌性 KM 系小鼠饲养至 12 月龄, 体重约 45 g; 病理性衰退模型小鼠组 (CY/BUS): 2 月龄雌性 KM 系小鼠, 给予 CY 120 mg/kg 腹腔注射和 BUS 12 mg/kg 皮内注射各 1 次, 干预三周后用于实验。

**1.4 人卵巢组织采样** 采样自江西省妇幼保健院妇瘤科、南昌大学第二附属医院妇科因各种原因需切除卵巢的绝经期前患者, 经患者知情同意, 共获得 30 例卵巢组织。患者年龄在 20~62 岁间, 无激素服用史, 具体情况见表 1。取得样本组织后, 将其迅速置于预冷的含 10% 人血清白蛋白 (human serum albumin, HSA, Sigma) 的 PBS 溶液中, 低温冷藏运送至实验室, 备用。

**1.5 HE 染色** 参照本研究组已建立的方法<sup>[17]</sup>, 将不同处理组卵巢沾少量伊红染色剂后, 放入 4% 多聚甲醛中固定, 梯度乙醇依次脱水, 二甲苯透明、浸蜡, 石蜡包埋, 冷却后连续切片, 每张切片厚度约为 4  $\mu\text{m}$ , 贴附于预先用多聚赖氨酸处理的载玻片上常规 HE 染色, 显微镜下观察拍照, 参照文献<sup>[25]</sup>对卵泡进行分级 (原始卵泡、成熟卵泡和闭锁卵泡)。

**1.6 免疫组织化学染色法** 1.5 节所得石蜡包埋切片进行以下处理: (1) 烤片、脱蜡与复水: 58  $^{\circ}\text{C}$  烤片 1 h 后开始脱蜡, 依次将切片置于二甲苯中完成脱蜡, 再依次置于 100%、100%、95%、95%、85%

表1. 人卵巢样本一览表

Table 1. The list of human ovarian samples

Age (years)	No. of sample	Clinical symptoms	Disease inspection situation
20-35 (adolescence)	11	Ovarian cyst, cystic endometrial cyst or ovarian endometrial cyst	No suspected cancer cells or cancer cells
36-50 (middlescence)	12	Ovarian cyst, cystic endometrial cyst or ovarian endometrial cyst	No suspected cancer cells or cancer cells
51-60 (senescence)	7	Ovarian cyst	No suspected cancer cells or cancer cells

和 70% 梯度酒精 (每个梯度 2 min) 复水。(2) 切片抗原暴露与修复: 切片浸于 pH 6.0 的柠檬酸盐缓冲液, 于微波炉中高火处理 4.5 min, 室温自然冷却至 90 °C 以下, 重新置于微波炉中低火处理 2.5 min 后取出, 室温冷却至 90 °C 以下时重复上一步骤, 最后取出于室温冷却至 37 °C 以下。PBS 洗 3 次, 每次 5 min。(3) 去除过氧化物酶: 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 完全覆盖组织片, 处理 10 min 去除过氧化物酶。(4) 血清封闭: 将切片置于 10% BSA 中, 37 °C 恒温箱孵育 1 h;(5) 滴加抗 YAP1、MST1、LATS2、OCT4、MVH、pYAP1 抗体 (稀释比例均为 1:100), 湿盒中 4 °C 过夜, PBS 洗 3 次, 各 5 min;(6) 滴加二抗: 分别加羊抗鼠或羊抗兔二抗稀释液 (稀释比例均为 1:100), 37 °C 湿盒中孵育 1 h, PBS 洗 3 次, 各 5 min。(7) 加 DAB 显色剂 (碧云天), 于普通显微镜下观察, 棕黄色或棕褐色为阳性, 并用自来水冲洗切片终止显色;(8) Harris 苏木素复染 30 s 左右, 水洗后用 1% 的盐酸酒精分化, 再用 PBS 冲洗返蓝;(9) 封片, 拍照: 采用中性树胶封片, 待干燥后于普通显微镜下观察, 并拍照。本实验的阴性对照不滴加一抗。

**1.7 免疫组织荧光染色法** 切片脱蜡、抗原修复和去除过氧化物酶操作同 1.6 节: 用 10% BSA 封闭, 37 °C 恒温箱中 1 h; 同时向玻片上滴加兔源抗 MST1、OCT4 与鼠源抗 YAP1、LATS2、MVH 抗体 (稀释比例均为 1:100), 湿盒中 4 °C 过夜; 次日 PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 分别加羊抗鼠与羊抗兔二抗 (稀释比例均为 1:100), 37 °C 孵育 1 h, PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 避光加 DAPI (1:5 000), 37 °C 湿盒内静置 15 min; 避光下弃液体, PBS 洗 3 次; 用中性树胶封片, 待干燥后于荧光显微镜下观察, 并拍照。

**1.8 Western blot** 采用细胞显微刷在体视显微镜下获取含卵巢皮层细胞的细胞悬液, 2 000 r/min 离心 5 min, 取沉淀。用 RIPA 裂解法提取不同处理组卵巢皮层总蛋白, 利用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离, 浓缩胶浓度为 5%, 分离胶浓度为 10%; 在 25 mA 恒流条件下电泳约 120 min; 之后在 4 °C、40 V 恒压下将凝胶内蛋白质电转移至 PVDF 膜上; 采用 5% BSA 封闭 1 h, PBST 洗涤 5 次, 每次 3 min; 分别用抗 YAP1、pYAP1、MST1、LATS2、OCT4 与 MVH 抗体 (稀释比例均为 1:1 000) 孵育 4 °C 过夜, PBST 洗涤 5 次, 每次 3 min; 次日加羊抗鼠或羊抗兔二抗稀释液 (稀释比例均为 1:200) 反应液, 37 °C 下摇育 1 h; TBST 洗 5 次, 每次 3 min; 最后

采用 ECL 显色液显色, 避光反应 5 min, 凝胶成像系统显影、定影。GAPDH 作为内参蛋白。

**1.8 数据统计检验与分析** 数据用 mean ± SD 表示, 采用 Graphpad Prism 5.0 统计软件进行统计学分析, 多组间统计检验采用方差分析 (ANOVA) 及 Dunnett-*t* 检验,  $P < 0.05$  时认为差异具有显著性意义。

## 2 结果

### 2.1 检测不同卵巢衰退模型中卵泡的变化

采用 HE 染色法检测不同卵巢衰退模型中卵泡耗竭情况, 结果显示, 与对照组比较, 病理性衰退模型小鼠原始卵泡、成熟卵泡及黄体的数目显著降低, 且出现大量的闭锁卵泡。当小鼠年龄达到 12 月龄 (生理性衰退) 时, 原始卵泡及成熟卵泡几乎不可见, 闭锁卵泡则逐渐增加 (图 1)。

来自临床病例中的卵巢皮层组织 HE 染色结果显示, 在青年期、中年期和老年期卵巢中, OSE 结构随着年龄的增长变得松散, 此外皮层表皮细胞也随着年龄的增长而逐渐减少 (图 1)。

### 2.2 Hippo 信号分子、MVH 及 OCT4 在小鼠不同卵巢衰退模型中的表达变化

如图 2 所示, 在病理性和生理性衰退模型小鼠卵巢皮层中 Hippo 信号分子、MVH 及 OCT4 均存在不同水平的表达。如图 3 所示, YAP1、LATS2 和 MST1 的表达水平在病理性和生理性衰退模型小鼠卵巢皮层中均低于对照组。与 LATS2 和 MST1 相似, 与对照组相比, 在病理性和生理性衰退模型小鼠卵巢中 MVH/OCT4 表达均水平显著降低。

Western blot 结果显示, 与对照组相比, 病理性衰退小鼠的 MST1、YAP1 与 LATS2 蛋白表达均显著降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ , 图 4A)。然而, 与病理性衰退模型小鼠相比, 生理性衰退模型小鼠卵巢中 MST1 蛋白表达显著提高 ( $P < 0.01$ ); 和对照组相比, pYAP1 蛋白在病理性和生理性衰退模型小鼠卵巢中显著降低 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。此外, 和对照组相比, 病理性衰退模型小鼠卵巢 pYAP/YAP 比值显著升高 ( $P < 0.05$ ), 而生理性衰退模型小鼠没有显著变化 (图 4A)。

与对照组相比, 病理性和生理性衰退模型小鼠卵巢 OGSCs 标记因子 MVH、OCT4 的表达均显著性降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) (图 4B)。此外, 与生理性衰退模型小鼠相比, 病理性衰退模型小鼠卵巢中 MVH 和 OCT4 的蛋白表达无显著差异。

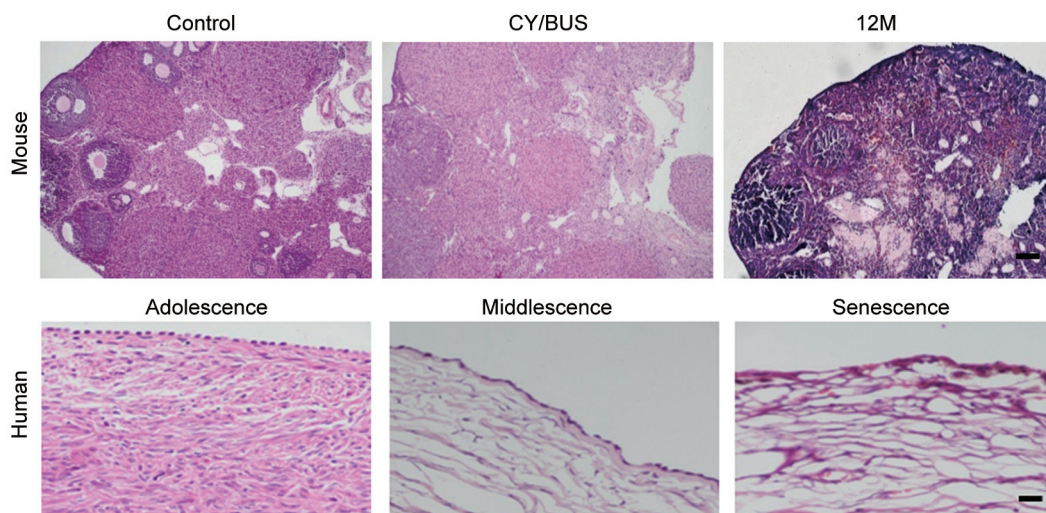


图 1. 不同卵巢衰退模型小鼠和不同年龄阶段妇女卵巢中卵泡的变化

Fig.1. Changes of follicles in the ovaries of retrogressed ovarian mice models and women at different stages detected by HE staining. Scale bar, 100  $\mu$ m (upper line) or 50  $\mu$ m (lower line).

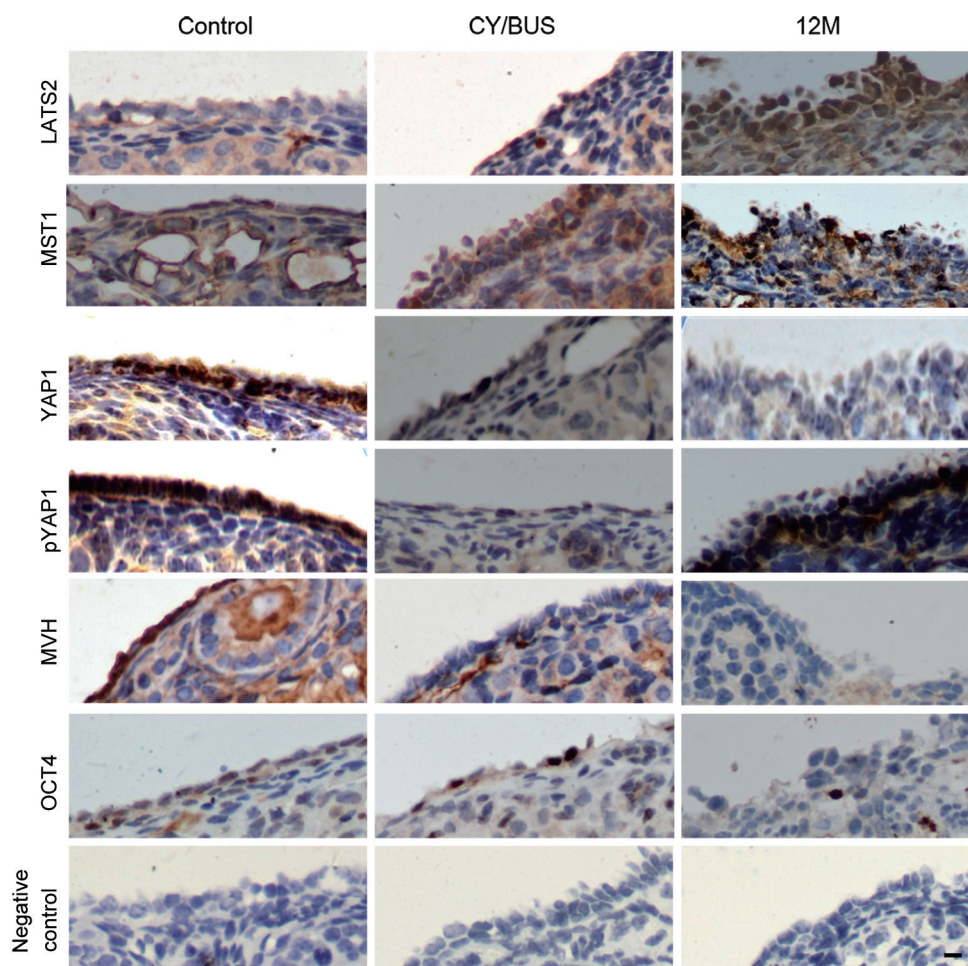


图 2. 免疫组化法检测Hippo信号分子、MVH及OCT4在不同卵巢衰退模型中的表达变化

Fig. 2. Expression of Hippo signaling molecules and OGSC specific markers in the ovarian cortexes of mouse by immunohistochemical staining. The positive cells were stained brown. Scale bar, 20  $\mu$ m.

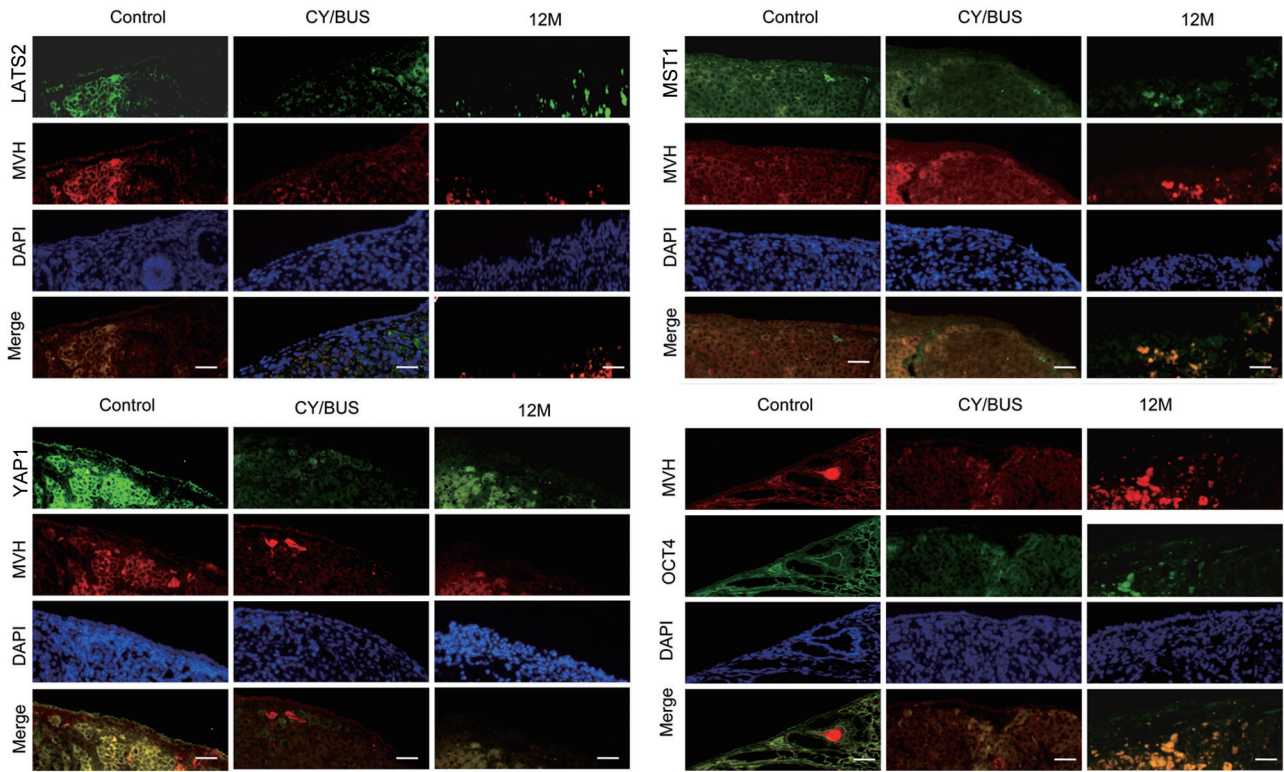


图 3. 免疫荧光法检测各组小鼠卵巢Hippo信号分子、MVH及OCT4表达

Fig. 3. Protein expression of Hippo signaling molecules, MVH and OCT4 in mice ovarian cortexes of different groups detected by immunofluorescence staining. The nucleus was stained by DAPI (blue). The positive cells were stained green or red. Scale bar, 20  $\mu\text{m}$ .

### 2.3 Hippo信号分子、MVH及OCT4在人卵巢衰退中的表达变化

采用双免疫荧光染色及 Western blot 方法，对临床 OSE 样本进行 OGSCs 特异性基因表达鉴定。双免疫荧光染色结果表明，MVH 和 OCT4 蛋白共表达于人 OSE 处，且随着年龄的增长而逐渐下降 (图 5)。

免疫荧光染色与 Western blot 结果表明，LATS2 表达在青年期女性 OSE 中最高，YAP1 和 pYAP1 表达水平在中年期女性最高，而 MST1 表达水平则在老年期女性最低 (图 5)。青年期 pYAP1/YAP1 比值显著高于中年期和老年期 ( $P < 0.05$ , 图 6A)，而老年期和中年期之间无显著性差异。和免疫荧光结果不同的是，Western blot 结果显示，OCT4 蛋白表达水平则随着年龄的增加而逐渐升高 ( $P < 0.01$ )；而 MVH 表达水平是随着年龄的增加而显著降低，但中年期与老年期间无明显差异。

## 3 讨论

Hippo 信号通路存在于哺乳动物 OSE 中，且

OSE 细胞的数量与 Hippo 信号通路间有着动态变化。本研究结果显示，在自然衰退及病理衰退的小鼠卵巢中已无正常卵泡，仅有一些闭锁卵泡存在；而临床上获取的人 OSE 结构随年龄的增加而逐渐变得松散，细胞也逐渐减少 (图 1)。这些结果表明本研究建立的生理性和病理性卵巢衰退模型是可靠的实验模型。另外，本研究结果显示，在不同年龄阶段人 OSE 中 Hippo 信号通路相关分子与 OGSCs 标记因子 (MVH 与 OCT4) 共表达，且 LATS2 蛋白表达水平在青年期最高，YAP1 蛋白表达水平在中年组最高，MST1 蛋白表达水平则在老年组中最低，由此可推测 Hippo 信号通路分子 LATS2、MST1 与 YAP1 和 OGSCs 标记因子 MVH 与 OCT4 共表达于不同年龄人 OSE 中，两者表达的变化存在明显的时序相关性。以上这些结果均提示 Hippo 信号通路可能通过调控 OGSCs 增殖和分化参与了卵巢功能的生理性衰退和病理性衰退过程。

本研究结果显示，MVH 与 OCT4 在生理性衰退和病理性衰退模型小鼠卵巢中表达均呈显著降低，提示干细胞巢中细胞的数量随着年龄的增加或

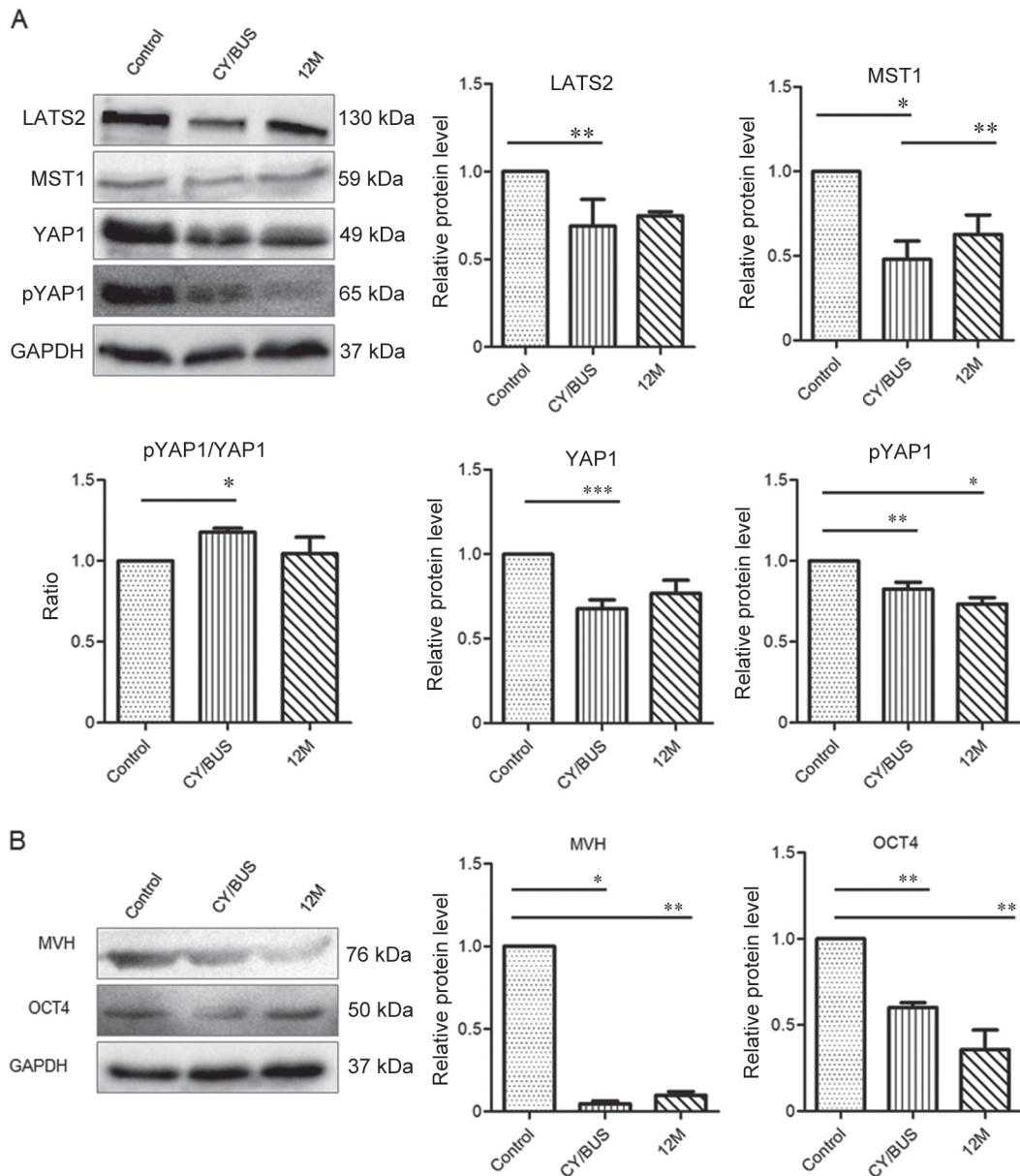


图 4. 各组卵巢皮质中Hippo信号分子、MVH及OCT4蛋白的表达情况

Fig. 4. Protein expression levels of Hippo signaling molecules (A) and OGSC specific markers (B) in mice ovarian cortexes of different groups detected by Western blot. The data are presented as the mean  $\pm$  SD. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

者药物的作用后呈逐渐减少的趋势,证明了OGSCs存在于OSE的“干细胞巢(niche)”中,且干细胞巢中细胞的数量是随着小鼠年龄的增加或药物作用而呈逐渐减少的趋势。有文献报道,随着小鼠的老龄化,OGSCs的数量逐渐减少,可能会导致卵泡池的消耗速率超过补充速率<sup>[3]</sup>。由此我们推测,OGSCs的衰老可能是卵巢衰老的根本原因,且OGSCs数目的变化可能是导致女性围绝经期症状的原因之一。此外,本研究结果显示,OCT4蛋白在

病理性和生理性衰退模型小鼠仍有表达,这也证明了在病变的卵巢中存在具有潜在作用的干细胞。上述结果提示,OGSCs的增殖受到抑制的关键原因可能是干细胞巢受损,这也可能是导致病理性卵巢衰老的主要原因。

本研究组前期研究显示,Hippo信号通路的主要效应因子能触发原始卵泡的启动<sup>[23]</sup>。本研究结果显示,与对照组相比,生理性衰退和病理衰退模型小鼠MST1和pYAP1表达均显著降低,因此我们

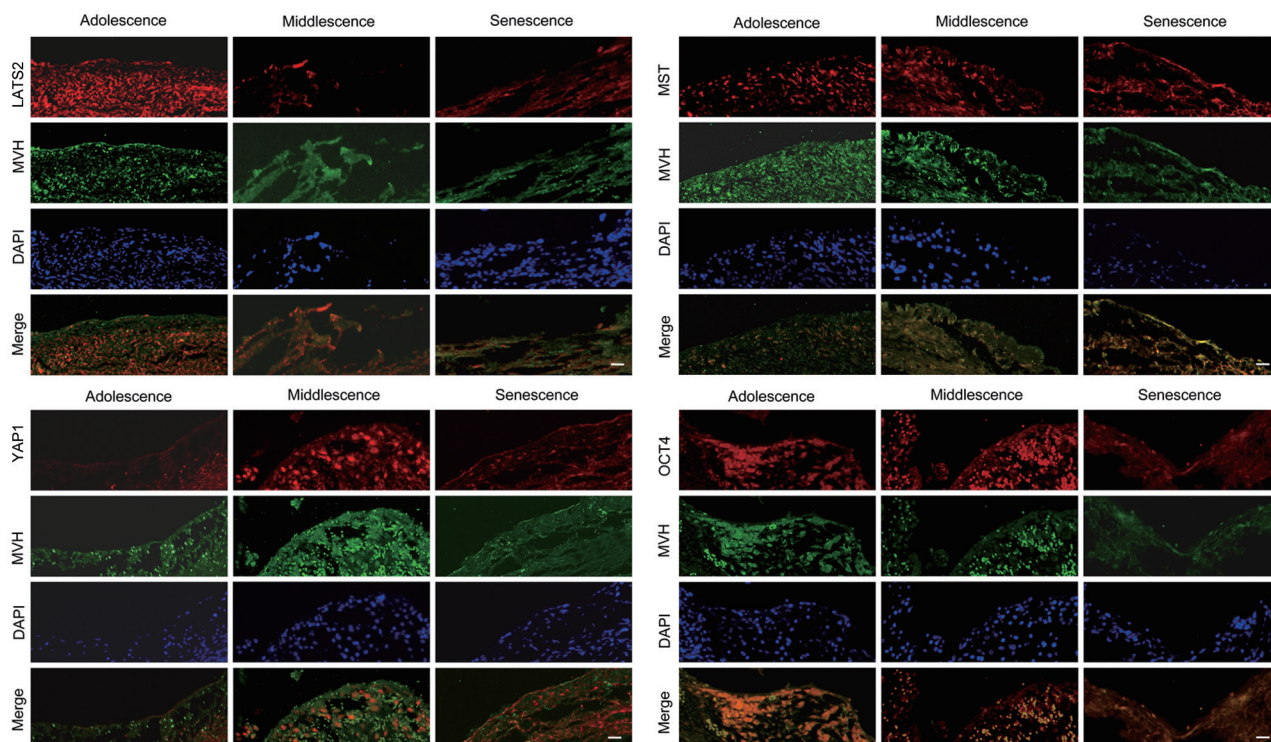


图 5. 不同年龄阶段女性卵巢上皮细胞(OSE)中Hippo信号分子、MVH及OCT4蛋白的表达情况

Fig. 5. Protein expression of Hippo signaling molecules, MVH and OCT4 proteins in ovarian surface epithelium (OSE) of females at different ages detected by double immunofluorescent staining. The positive cells were stained green or red. The nucleus was stained by DAPI (blue). Scale bar, 20  $\mu$ m.

推测随着年龄的逐渐增加或药物的作用, 伴随着卵泡消耗、垂体激素 [ 如卵泡刺激素 (follicle-stimulating hormone, FSH)、黄体生成素等 ] 水平升高及 OGSCs 的分化速率加快, 这种状态可维持到小鼠的 12 月龄, 也即女性的围绝经期。此外, 与对照组相比, 病理衰退模型小鼠中 pYAP1/YAP1 比值升高, 提示卵巢的衰老可激活 Hippo 信号通路激酶, 促进 YAP1 的 Ser127 位点发生磷酸化, 从而导致机体细胞核转运及生长受到抑制<sup>[26]</sup>。

本研究还观察了 Hippo 信号通路信号分子在人 OSE 处 OGSCs 中的表达变化, 结果显示, 随着年龄的增加, 人卵巢皮层逐渐变得松散, OSE 细胞数量减少。与生理性衰老小鼠 OSE 中相同的是, 在不同年龄阶段人 OSE 细胞中同样存在 Hippo 信号通路相关分子与 OGSCs 标记因子 (MVH 与 OCT4) 共表达, 且 MVH 的蛋白表达随着年龄的增长而逐渐下降, LATS2 表达在青春期最高, YAP1 和 pYAP1 的表达在中年期最高, 而 MST1 在老年期最低, pYAP1/YAP1 比值则从青年期到老年期逐渐降低, 而老年期和中年期间无显著性差异。由此可见, 在

不同年龄阶段女性 OSE 中 Hippo 信号分子表达的变化不同于生理性衰退模型小鼠 OSE。我们猜测可能存在更复杂的调节机制参与人 OGSCs 的发育调控过程, 从而影响 Hippo 信号通路的表达变化。

综上所述, 在小鼠卵巢功能发育的不同阶段, Hippo 信号通路在小鼠卵巢皮层中存在动态表达, 这与小鼠卵巢衰退过程中 OGSCs 相关因子的表达趋势相似, 提示在小鼠的病理和自然卵巢衰退过程中, Hippo 信号通路与 OGSCs 的发育有关。在后续研究中, 我们将进一步对 Hippo 信号通路与 OGSCs 的相互调控机制进行研究, 并采用慢病毒转染方法了解 Hippo 信号通路在卵巢衰老小鼠中的作用机制, 以期自体卵巢不孕和卵巢功能退化性等疾病的治疗提供理论基础。

### 参考文献

- Cheng J (成杰), Ding LJ, Hu YL. Research progress of the establishment of animal models of premature ovarian failure. *Chin J Comp Med (中国比较医学杂志)* 2013; 23(4): 66–70 (in Chinese with English abstract).
- Xu XF (许小凤), Tan Y. Progress in the establishment of



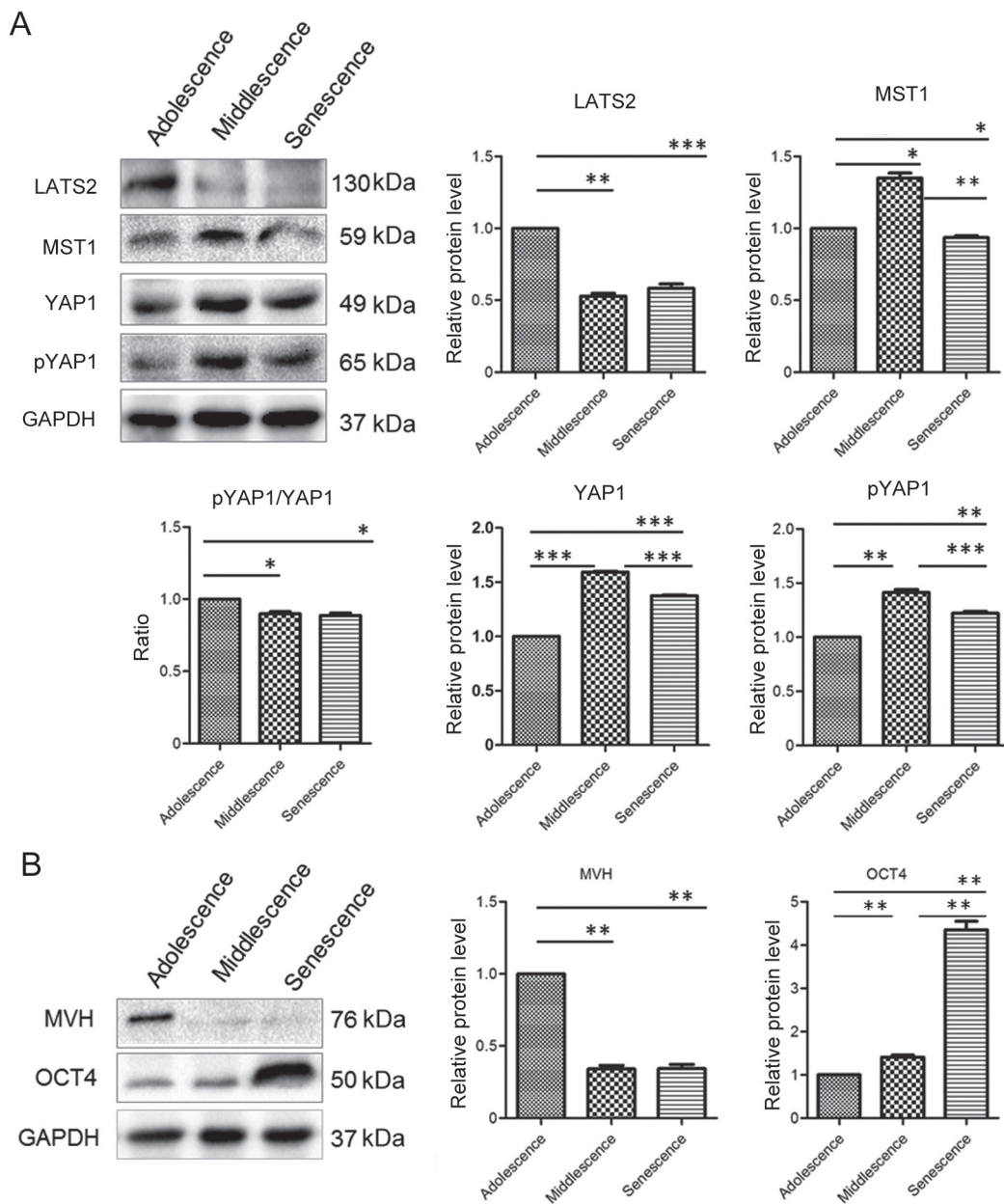


图 6. 不同年龄阶段女性卵巢上皮细胞(OSE)中Hippo信号分子、MVH及OCT4蛋白的表达情况

Fig. 6. Protein expression of Hippo signaling molecules (A), MVH and OCT4 (B) in ovarian surface epithelium (OSE) of females at different ages detected by Western blot. The data are presented as the mean  $\pm$  SD. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

- animal models with diminished ovarian reserve and premature ovarian failure. *Acta Lab Anim Sci Sin* (实验动物学报) 2008; 16(4): 309–312 (in Chinese with English abstract).
- Zheng WJ, Zhang H, Gorre N, Risal S, Shen Y, Liu K. Two classes of ovarian primordial follicles exhibit distinct developmental dynamics and physiological functions. *Hum Mol Genet* 2014; 23(4): 920–928.
  - Bhartiya D, Singh J. FSH-FSHR3-stem cells in ovary surface epithelium: basis for adult ovarian biology, failure, aging, and cancer. *Reproduction* 2015; 149(1): R35–R48.
  - Wu XY, Cai H, Kallianpur A, Li HL, Yang G, Gao J, Xiang YB, Ji BT, Tang Y, Zheng W, Shu XO. Impact of premature ovarian failure on mortality and morbidity among Chinese women. *PLoS One* 2014; 9(3): e89597.
  - Mutlu MF, Erdem A. Evaluation of ovarian reserve in infertile patients. *J Turk Ger Gynecol Assoc* 2012; 13: 196–203.
  - Pan DJ. The hippo signaling pathway in development and cancer. *Dev Cell* 2010; 19(4): 491–505.
  - Jin H, Zhang YL, Jing D, Li Y, Li J, Zhao ZH. Role of Hippo signaling in cancer stem cells. *J Cell Physiol* 2014; 229(3):

- 266–270.
- 9 Li MR, Zhang SH, Zhong BH. The role of Hippo signaling pathway in cancer and stem cells. *Chin J Gastroenterol Hepatol* 2013; 22(4): 389–392.
  - 10 Ramos A, Camargo FD. The Hippo signaling pathway and stem cell biology. *Trends Cell Biol* 2012; 22(7): 339–346.
  - 11 Tremblay AM, Camargo FD. Hippo signaling in mammalian stem cells. *Semin Cell Dev Biol* 2012; 23(7): 818–826.
  - 12 Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 2004; 428(6979): 145–150.
  - 13 Zou K, Yuan Z, Yang ZJ, Luo HC, Sun KJ, Zhou L, Xiang J, Shi LJ, Yu QS, Zhang Y, Hou RY, Wu J. Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. *Nat Cell Biol* 2009; 11(5): 631–636.
  - 14 Zhang C, Wu J. Production of offspring from a germline stem cell line derived from prepubertal ovaries of germline reporter mice. *Mol Hum Reprod* 2016; 22(7): 457–464.
  - 15 Park ES, Tilly JL. Use of DEAD-box polypeptide-4 (Ddx4) gene promoter-driven fluorescent reporter mice to identify mitotically active germ cells in post-natal mouse ovaries. *Mol Hum Reprod* 2015; 21(1): 58–65.
  - 16 Wu CQ, Xu B, Li XY, Ma WZ, Zhang P, Chen XJ, Wu J. Tracing a characterizing the development of transplanted female germline stem cells *in vivo*. *Mol Ther* 2017; 25(6): 1408–1419.
  - 17 Li J, Zhou FY, Zheng TC, Pan ZZ, Liang X, Huang J, Zheng LP, Zheng YH. Ovarian germline stem cells (OGSCs) and the Hippo signaling pathway association with physiological and pathological ovarian aging in mice. *Cell Physiol Biochem* 2015; 36: 1712–1724.
  - 18 Patel H, Bhartiya D, Parte S. Further characterization of adult sheep ovarian stem cells and their involvement in neo-oogenesis and follicle assembly. *J Ovarian Res* 2018; 11: 3.
  - 19 Halder G, Johnson RL. Hippo signaling: Growth control and beyond. *Development* 2011; 138(1): 9–22.
  - 20 Badouel C, Garg A, McNeill H. Herding Hippos: Regulating growth in flies and man. *Curr Opin Cell Biol* 2009; 21(6): 837–843.
  - 21 Woodruff TK, Shea LD. A new hypothesis regarding ovarian follicle development: Ovarian rigidity as a regulator of selection and health. *J Assist Reprod Genet* 2011; 28(1): 3–6.
  - 22 Zhang X, George J, Deb S, Degoutin JL, Takano EA, Fox SB, AOCS Study group, Bowtell DD, Harvey KF. The Hippo pathway transcriptional co-activator, YAP, is an ovarian cancer oncogene. *Oncogene* 2011; 30(25): 2810–2822.
  - 23 Xiang C, Li J, Hu LL, Huang J, Luo T, Zhong ZS, Zheng YH, Zheng LP. Hippo signaling pathway reveals a spatio-temporal correlation with the size of primordial follicle pool in mice. *Cell Physiol Biochem* 2015; 35(3): 957–968.
  - 24 Li XY (李小燕), Cao X, Liu XY, Ye HD, Su T, Zheng TC, Mao Z, Zheng YH. Effects of COS on promoting the pathological ovarian aging mice ovarian function by regulating immune function. *Chin J Appl Physiol (中国应用生理学杂志)* 2017; 33(2): 92–102 (in Chinese with English abstract).
  - 25 Gougeon A. Neo-oogenesis in the postnatal ovary: fantasy or reality? *Gynecol Obstet Fertil* 2005; 33(10): 819–823.
  - 26 Fu D, Lv X, Hua G, He C, Dong J, Lele SM, Li DW, Zhai Q, Davis JS, Wang C. YAP regulates cell proliferation, migration, and steroidogenesis in adult granulosa cell tumors. *Endocr Relat Cancer* 2014; 21(2): 297–310.