

新生大鼠卵巢体外培养中 NT3 与 LIF 对始基卵泡发育的影响

冯月枝, 邱 绮, 杨冬梓, 张清学

(中山大学孙逸仙纪念医院生殖医学中心, 广东 广州 510120)

摘要: 【目的】研究 NT3 对早期卵泡存活、发育、激素合成的影响及其可能的作用机制,同时探讨 NT3 和 LIF 在早期卵泡启动发育方面是否存在协同或叠加效应。【方法】分离新生 4d 大鼠卵巢随机分配至新鲜组、基础培养组、NT3 组、LIF 组和 NT3+LIF 组,在 37 °C 培养箱中培养 14 d,经固定、包埋、切片后进行组织形态学、PCNA 免疫组化、TUNEL 凋亡分析,RT-PCR 检测 KL mRNA 表达及检测培养液中激素水平。【结果】相比新鲜组和基础培养组,NT3 组、LIF 组、NT3+LIF 组中的始基卵泡比例下降,生长卵泡比例升高,同时 PCNA 蛋白表达显著增加;TUNEL 分析显示 NT3 组、LIF 组、NT3+LIF 组的凋亡指数均显著降低;NT3、LIF 组、NT3+LIF 组卵巢中 KL mRNA 的表达量分别是对照组的 (3.38 ± 0.43) 倍、 (2.02 ± 0.20) 倍、 (2.07 ± 0.21) 倍。【结论】NT3 在早期卵泡存活、发育中有促进作用,上调 KL 基因表达可能是 NT3 的作用机制之一。NT3 和 LIF 单独或相加均能促进卵泡发育,但两者之间无明显协同或叠加效应。

关键词: NT3; LIF; 卵泡发育; 体外培养; 大鼠

中图分类号: R711.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2016)04-0535-08

Effects of NT3 and LIF on Development of Primordial Follicles During In Vitro Culture of Neonatal Rat Ovary

FENG Yue-zhi, QIU Qi, YANG Dong-zi, ZHANG Qing-xue

(IVF Centre, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Corresponding author: ZHANG Qing-xue, E-mail: zhangqingxue666@yahoo.com

Abstract: 【Objective】To explore the interacting effect of NT3 and LIF on the survival and initiation of primordial follicles, and investigate the possible mechanism underlying NT3 contributes to follicular development. 【Methods】Ovaries from 4 day-old rats were cultured for 14 days in the basic medium supplemented with NT3, LIF alone or combined. Fresh (fresh control, FC) and basic medium cultured (cultured control, CC) ovaries were set as controls. The developmental stages and viability of follicles were assessed using histomorphology and TUNEL labeling. Immunohistochemistry for PCNA was performed to evaluate the mitotic activity of granulosa cells. Measurement of androstenedione and estradiol in the medium was performed and the expression of KL mRNA in the ovary was examined. 【Results】After culture, follicles sustained healthy and less apoptotic cells were found in the presence of NT3 or LIF. Furthermore, the proportion of developmental follicles increased and the percentage of granulosa cells that stained for PCNA was significantly higher. However, when combined NT3 with LIF, no obvious additional effect was found. The expression of KL mRNA in the NT3, LIF, NT3+LIF group is 3.38 ± 0.43 , 2.02 ± 0.20 , 2.07 ± 0.21 times higher than in the CC group. 【Conclusion】NT3, LIF alone or combined had a stimulative effect on the survival and development of primordial follicles. However, there was no obvious synergistic or additional effect between LIF and NT3. One of the mechanisms of NT3 underlying the initiation of primordial follicles might activate c-kit/KL interactions.

Key words: neurotrophin3 (nt3); leukemia inhibitory factor (LIF); follicle development; in vitro culture; rat

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2016, 37(4): 535-542]

收稿日期: 2016-01-25

基金项目: 广东省自然科学基金(S2011010004662)

作者简介: 冯月枝, 硕士研究生, 住院医师, 研究方向: 生殖医学, E-mail: 516867125@qq.com; 张清学, 通信作者, 主任医师, 博士生导师, E-mail: zhangqingxue666@yahoo.com

卵泡的生长发育与体外受精-胚胎移植(in vitro fertilization-embryo transfer, IVF-ET)的成功与否密切相关。卵泡发育成熟需要经历两个阶段,即从始基卵泡启动发育至窦卵泡的初始募集阶段,及从窦卵泡至排卵前卵泡的周期募集阶段。IVF 中控制性促排卵(controlled ovarian stimulation, COS)的应用通过控制卵泡发育的周期募集阶段,使多个窦卵泡同步生长并发育成熟,大大提高了 IVF 的效率^[1]。然而,约 9%~24%^[2]患者在 COS 中出现卵巢反应不良(poor ovarian response, POR),妊娠率仅为 3.2%~14%^[3]。对于这些卵巢反应不良患者,少量甚至无卵泡发育导致可受精卵子减少是 IVF 失败的重要原因^[4]。随着卵巢反应性的降低,进入初始募集的始基卵泡减少,将导致进入周期募集的卵泡即对 FSH 敏感的卵泡减少,从而导致女性生育力的下降。因此,研究始基卵泡的启动发育机制,对提高女性生育力有重大意义,并将更好地应用于辅助生育技术。然而,始基卵泡启动募集涉及的多种因子及其相互作用很复杂。神经营养因子(neurotrophins, NT)家族是近年研究的热点之一,我们既往的研究发现 NT 中的神经生长因子(nerve growth factor, NGF)能促进始基卵泡向初级卵泡的转化和存活,另有学者^[5]研究脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)和神经营养因子 4/5 (neurotrophin4/5, NT4/5)在卵泡发育中的作用,而神经营养因子 3 (neurotrophin3, NT3)对早期卵泡存活及启动发育、激素分泌的影响及其作用机制仍不清楚。白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)是另一个与卵子发育密切相关的因子,卵泡液中的 LIF 水平随着卵子的生长发育而升高^[6],另有研究显示 LIF 能促进始基卵泡向初级卵泡的转化^[7]。Nilsson 等进一步表明 LIF 可通过上皮生长因子(epithelial growth factor kit ligand, KL)促进原始卵泡启动生长,体外培养颗粒细胞能明显促进 KL mRNA 的表达^[8]。在神经系统中,LIF 能协同 NT 促进神经元的再生和存活^[9],卵泡的发育需要多种因子的相互作用,因此 NT3 和 LIF 在早期卵泡启动发育方面是否存在协同或叠加效应值得我们探讨。本实验采用新生大鼠卵巢体外培养的方法,单独或同时添加 NT3 和 LIF,观察 NT3 对启动始基卵泡发育的作用及其可能作用机制,同时探讨 NT3 和 LIF 在早期卵泡启动发育方面是否存在协

同或叠加效应。

1 材料与方法

1.1 标本

卵巢标本取自出生 4 d 雌性 SD 大鼠,购于中山大学中山医学院实验动物中心。SD 乳鼠,清洁级,体质量 10~15 g,饲养在 22~25 °C 的清洁环境中,昼夜交替,以蒸馏水和饲料饲养,动物许可证号:44008500000121。

1.2 主要试剂

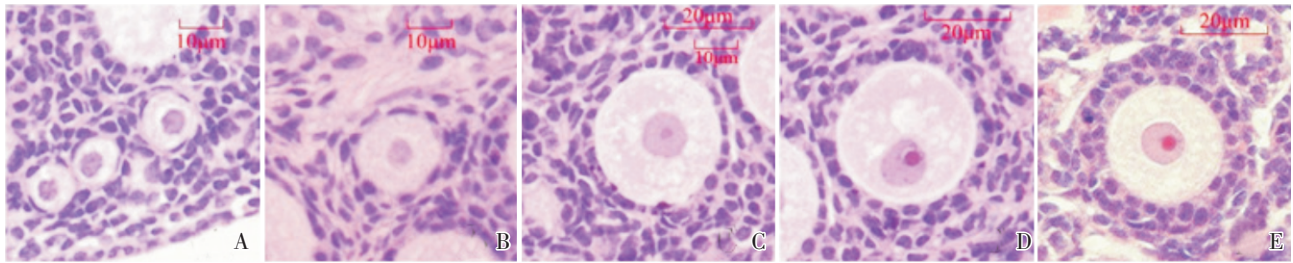
NT3 购自 R&D Systems 公司,LIF 购自美国 Chemicon Millipore 公司,D-MEM/F12 液体培养基、ALBUMAX II、胰岛素转铁蛋白硒酸(ITS-X)、Penicillin Streptomycin、Fungizone、PCR 引物均购自美国 Invitrogen 公司,牛血清白蛋白(BSA)、L-ascorbic acid 均购自 Sigma 公司,Trizol reagent、Reverse Transcription System、Taq DNA 聚合酶、dNTPs 均购自 TAKARA 公司,PCNA 一抗、免疫组化通用型检测试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司,TUNEL 凋亡试剂盒购自 ROCHE 公司,雌二醇测定试剂盒购自美国 BECKMAN 公司,雄烯二酮 ELISA 检验试剂盒购自德国 DRG 公司。

1.3 卵巢的体外培养

解剖分离大鼠卵巢,随机分配到 5 组(新鲜组、基础培养组、NT3 组、LIF 组、NT3+LIF 组)。新鲜组直接进行组织形态学等检查,余参考 Nilsson 报道^[13]的方法使用悬挂式细胞培养皿进行体外培养。基础培养组以基础培养液(D-MEM/F12 中加入 1 mg/mL ALBUMAXII、1 mg/mL BSA、体积分数 1%ITS-X、0.05 mg/mL 抗坏血酸、青霉素 50 U/mL、链霉素 50 U/mL、氟康唑 50 U/mL)培养;NT3 组、LIF 组分别在上述基础培养液中加入 NT3、LIF 工作液,使其最终浓度均为 50 ng/mL;NT3+LIF 组在基础培养液中同时加入 NT3 和 LIF 工作液 600 μ L。卵巢在 37 °C,体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养 2 周,每 48 h 更换培养液一次,每次更换 300 μ L,放在 0.5 mL EP 管内,放置 -20 °C 冰箱保存以备测激素水平。培养后的卵巢行组织形态学、增殖细胞核抗原(PCNA)免疫组化、TUNEL 凋亡分析和 PCR 检测 KL-mRNA 的表达。

1.4 组织形态学分析

卵泡形态和分级参考以下标准^[10]:①形态正



A: primordial follicle; B: early primary follicle; C: primary follicle; D: transitional follicle; E: pre-antral follicles; $\times 400$

图1 早期卵泡的分级图

Fig.1 Classification of early follicles

常的卵泡:完整的卵母细胞,内见圆形的细胞核及清晰的核仁,包绕的颗粒细胞排列规则,无核固缩;②形态学异常的卵泡:卵泡结构不完整或消失,卵母细胞皱缩,卵母细胞核固缩,颗粒细胞排列紊乱。

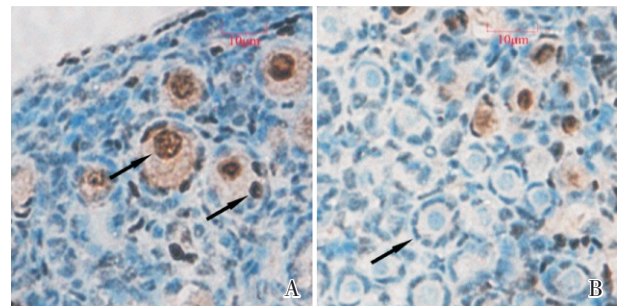
卵泡分级:0级(始基卵泡),初级卵母细胞和部分/完全围绕卵母细胞的一层扁平的前颗粒细胞;1级(早初级卵泡),初级卵母细胞被一层扁平梭形/柱状混合颗粒细胞环绕;2级(初级卵泡),初级卵母细胞周围环绕一层柱状颗粒细胞,3级(转化期卵泡),初级卵母细胞被1~2层柱状颗粒细胞环绕;4级(窦前卵泡),具有2层或2层以上柱状颗粒细胞环绕一个卵母细胞,而无窦状腔隙形成(图1)。

1.5 PCNA 免疫组化分析

按照 PCNA 免疫组化试剂盒说明,切片经脱蜡、水化、漂洗,滴入过氧化物酶阻断溶液孵育 5 min;高压抗原修复后山羊血清封闭 10 min,滴加一抗室温 40 min,用 PBS 代替一抗作为阴性对照;PBS 冲洗后滴加二抗,室温下放置 40 min;DAB 显色,苏木素复染,中性树胶封片。光学显微镜下进行 PCNA 阳性细胞计数,卵泡内至少有一个颗粒细胞出现明显着色,为 PCNA 阳性卵泡。使用 Image-Pro Plus 图像分析软件进行 PCNA 阳性细胞计数,后用 PCNA 阳性卵泡百分率来评价卵泡生长情况(图2)。

1.6 TUNEL 凋亡分析

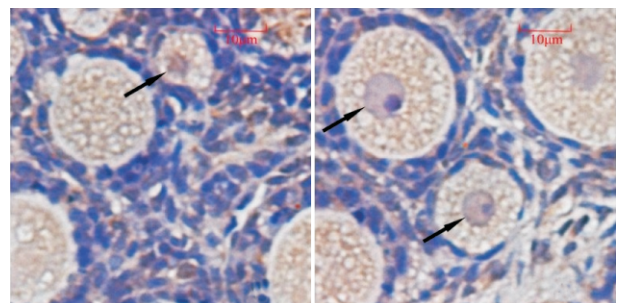
参照 ROCHE 凋亡试剂盒说明,切片经脱蜡、水化、漂洗,滴加蛋白酶 K 孵育 15 min,过氧化氢浸泡玻片 5 min;滴加 TUNEL 反应液暗室中 37 °C 下孵育 60 min;滴加 Converter-POD 在 37 °C 水浴箱中孵育 30 min;DAB 显色,苏木素复染,中性树胶封片。光学显微镜下进行卵泡凋亡指数



A: PCNA positive oocyte and granulosa cell; B: PCNA negative oocyte and granulosa cell, $\times 400$

图2 PCNA 免疫组化评价卵泡的发育情况图

Fig.2 Immunohistochemistry of PCNA in rat ovaries



A) TUNEL positive oocyte; B) TUNEL negative oocyte and granulosa cell; $\times 400$

图3 TUNEL 分析卵巢皮质卵泡及间质凋亡情况

Fig.3 Immunohistochemistry of TUNEL in rat ovaries

(apoptotic index of follicle, AIF)和间质细胞凋亡指数(apoptotic index of stroma, AIS)的计算。细胞核内出现明显弥散性或颗粒性的深蓝色染色为凋亡阳性细胞;卵母细胞内或、和 $\geq 50\%$ 颗粒细胞出现 TUNEL 阳性染色为凋亡卵泡(图3)。

1.7 培养液中激素测定

培养完成后用 ACS:180 自动化学免疫发光仪,使用 Access 免疫测定系统测定培养液中的雌

二醇水平,浓度由所储存的多点校准曲线来确定。用酶标仪测定雄烯二酮水平,以吸光度 OD 值为纵坐标,标准品浓度为横坐标,得到相应的拟合曲线($R^2 > 0.999$),样品的浓度检测值由标准曲线换算得出。

1.8 Real-time PCR

根据 Trizol 说明书提取 RNA,按照 TAKARA PrimeScript® RT Master Mix Perfect Real Time 方法,根据每个样本的 RNA 浓度,进行逆转录反应。目的基因 KL 的引物是 5'-CTG TTG CAG CCA GTT CCC TTA-3' 和 5'-AGT GCC ATT GCT GTC CAT TG-3',内参基因核糖体蛋白 S2 的引物是 5'-GAC TAC AAT GGC CAC GTT GGT-3' 和 5'-CAC TGG GAC GAT CGA AAG CT-3'。将得到的 RT 反应液加入到 Real Time PCR 反应体系中,在 ABI PRISM® 7500 Real-Time PCR System 进行 PCR 扩增反应,结束后确认扩增曲线和融解曲线,进行 PCR 定量时制作标准曲线等。结果按拷贝数记录并进行分析,最终计算结果按下列公式换算: $-\Delta\Delta C_T = -[研究组 (C_{T 目的基因} - C_{T 内参基因}) - 对照组 (C_{T 目的基因} - C_{T 内参基因})]$, $A = 2^{-\Delta\Delta C_T}$ 。

1.9 统计分析

使用统计软件 SPSS 19.0 进行统计分析。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组比较采用 one-way ANOVA 或 Kruskal-Wallis 检验,方差齐同时组间两两比较用 Bonferroni 或 LSD 法;KL mRNA 含量实验组与对照组的比较采用独立样本 t 检验;激素水平在各个时间点的比较采用重复测量方差分析;以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

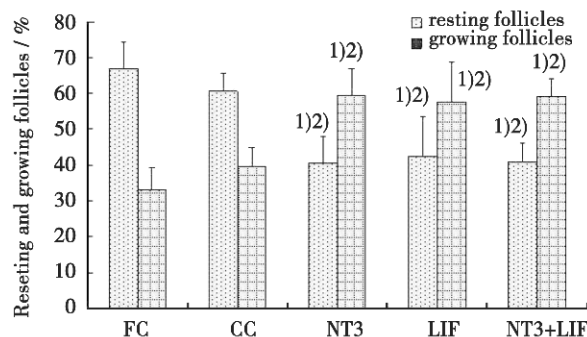
2 结果

2.1 组织形态学评价卵巢体外培养卵泡的发育情况

卵巢培养后切片上仍有大量健康卵泡存活,各组卵巢切片的卵泡总数见表 1,新鲜组、基础培养组、NT3 组、LIF 组、NT3+LIF 组卵巢切片的卵泡总数无统计学差异($P > 0.05$)。

对卵泡进行分级(图 1),NT3 组、LIF 组、NT3+LIF 组始基卵泡的比例明显减少,余各级卵泡比例明显上升(表 2)。按 Oktay K 的卵泡分级标准,0 级为静息卵泡,1、2、3、4 级为生长卵泡,各组

卵巢切片的静息卵泡和生长卵泡比例见图 4。与新鲜组和基础培养组相比较,NT3 组、LIF 组、NT3+LIF 组静息卵泡比例下降,生长卵泡比例上升,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。



1) $P < 0.05$ vs FC group; 2) $P < 0.05$ vs CC group

图 4 各组卵巢中静息卵泡和生长卵泡的比例图

Fig.4 Resting follicles and growing follicles

2.2 PCNA 免疫组化染色评价卵泡生长

各组卵巢中卵泡 PCNA 的免疫组化结果见表 3,在 NT3 组、LIF 组、NT3+LIF 组中培养的卵巢,PCNA 蛋白的表达显著增加,与新鲜组、基础培养组比较的差异均有统计学意义($P < 0.001$)。

2.3 TUNEL 免疫组化评价卵泡及间质细胞的凋亡情况

在基础培养组(共 304 个卵泡)和 LIF 组(共 208 个卵泡)各发现 2 个卵母细胞凋亡,其余组均未发现凋亡的卵母细胞(图 3)。卵巢间质细胞的凋亡情况见表 4,NT3 组、LIF 组、NT3+LIF 组的凋亡指数均显著低于基础培养组($P < 0.01$),其中,LIF 组卵巢间质的凋亡指数最低,与 NT3 组、NT3+LIF 组比较均有统计学差异($P < 0.01$)。

2.4 各组培养液中雄烯二酮和雌二醇水平的比较

收集各培养组第 2、4、6、8、10、12、14 天更换的培养液,同组的每 2 孔培养液合并,即每 600 μ L 形成一个测量单位。雄烯二酮(表 5)在各个时间点各组无显著差异($P > 0.05$),重复测量的方差分析提示处理主效应无统计学意义($F = 0.64, P = 0.604$)。雌二醇在各个时间点各组也无显著差异($P > 0.05$),方差分析也提示处理主效应无统计学意义($F = 0.38, P = 0.586$;表 6)。

2.5 卵巢组织中 KL mRNA 的表达水平

RT-PCR 检测结果显示,以基础培养组作为

表 1 各组卵巢中的卵泡总数

Table 1 Number of viable follicles in 5 groups

Treatment	FC(<i>n</i> = 12)	CC(<i>n</i> = 16)	NT3(<i>n</i> = 14)	LIF(<i>n</i> = 13)	NT3+LIF(<i>n</i> = 18)	<i>P</i> value
Total follicles	139 ± 32.32	129.1 ± 26.6	136.4 ± 11.8	125.7 ± 6.11	126 ± 7.55	<i>P</i> = 0.128

FC: fresh control group; CC: cultured control group

表 2 各组卵巢中各级卵泡的比例

Table 2 The percentages of follicles at different stages in all treatment groups

(%)

Treatment	FC(<i>n</i> = 12)	CC(<i>n</i> = 16)	NT3(<i>n</i> = 14)	LIF(<i>n</i> = 13)	NT3+LIF(<i>n</i> = 18)	<i>P</i> value
Primordial follicle	66.87 ± 7.45	60.52 ± 5.22	40.66 ± 7.4 ¹⁾²⁾	42.33 ± 11.2 ¹⁾²⁾	40.76 ± 5.27 ¹⁾²⁾	< 0.001
Early primary follicle	25.51 ± 6.01	28.28 ± 5.41	31.6 ± 6.34 ¹⁾	30.94 ± 6.60 ¹⁾	34.64 ± 7.12 ¹⁾²⁾	0.047
Primary follicle	3.43 ± 1.87	8.04 ± 2.74	13.76 ± 6.08 ¹⁾²⁾	11.47 ± 4.63 ¹⁾²⁾	15.45 ± 4.42 ¹⁾²⁾	< 0.001
Transitional follicle	3.07 ± 1.58	2.48 ± 0.84	7.12 ± 4.40 ¹⁾²⁾	8.71 ± 5.70 ¹⁾²⁾	6.27 ± 3.30 ¹⁾²⁾	< 0.001
Pre-antral follicle	1.10 ± 0.53	0.68 ± 0.84	6.56 ± 4.20 ¹⁾²⁾	6.63 ± 7.38 ¹⁾²⁾	2.35 ± 2.96 ³⁾⁴⁾	< 0.001

1) *P* < 0.05 vs FC group; 2) *P* < 0.05 vs CC group; 3) *P* < 0.05 vs NT3 group; 4) *P* < 0.05 vs LIF group; 5) *P* < 0.05 vs NT3+LIF group

表 3 各组卵巢中卵泡 PCNA 的表达情况

Table 3 The percentages of PCNA positive follicles in all treatment groups

($\bar{x} \pm s$)

Treatment	FC(<i>n</i> = 12)	CC(<i>n</i> = 16)	NT3(<i>n</i> = 14)	LIF(<i>n</i> = 13)	NT3+LIF(<i>n</i> = 18)	<i>P</i> value
PCNA negative	65.83 ± 2.34 ²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾	55.24 ± 2.69 ¹⁾³⁾⁴⁾⁵⁾	46.8 ± 2.98	45.09 ± 2.69	46.69 ± 2.08	0.005
PCNA positive	34.17 ± 2.34 ²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾	44.77 ± 2.69 ¹⁾³⁾⁴⁾⁵⁾	53.2 ± 2.98	54.91 ± 2.69	53.31 ± 2.08	0.005

1) *P* < 0.05 vs FC group; 2) *P* < 0.05 vs CC group; 3) *P* < 0.05 vs NT3 group; 4) *P* < 0.05 vs LIF group; 5) *P* < 0.05 vs NT3+LIF group

表 4 各培养组卵巢间质细胞凋亡指数

Table 4 Proportions of TUNEL-positive cells in rat ovaries

	Basic group(<i>n</i> = 16)	NT3 group(<i>n</i> = 14)	LIF group(<i>n</i> = 13)	NT3+LIF group(<i>n</i> = 18)	<i>P</i>
TUNEL positive	17.55 ± 1.93 ¹⁾²⁾³⁾	15.01 ± 1.84	12.58 ± 1.05 ¹⁾³⁾	14.22 ± 1.28	< 0.01

1) *P* < 0.05 vs NT3 group; 2) *P* < 0.05 vs LIF group; 3) *P* < 0.05 vs NT3+LIF group

表 5 各处理组培养液中雄烯二酮水平变化

Table 5 Levels of androstenedione in different groups during culture

(pg/mL)

	Day2	Day4	Day6	Day8	Day10	Day12	Day14
CC	0.052 ± 0.014	0.071 ± 0.021	0.090 ± 0.078	0.057 ± 0.021	0.046 ± 0.011	0.041 ± 0.007	0.037 ± 0.006
NT3	0.093 ± 0.061	0.042 ± 0.009	0.033 ± 0.001	0.029 ± 0.002	0.036 ± 0.006	0.032 ± 0.001	0.064 ± 0.043
LIF	0.039 ± 0.004	0.036 ± 0.002	0.045 ± 0.012	0.098 ± 0.053	0.111 ± 0.060	0.082 ± 0.039	0.039 ± 0.001
NT3+LIF	0.046 ± 0.036	0.082 ± 0.050	0.077 ± 0.030	0.049 ± 0.020	0.032 ± 0.010	0.031 ± 0.004	0.035 ± 0.005
<i>P</i> value	0.509	0.41	0.647	0.195	0.086	0.111	0.299

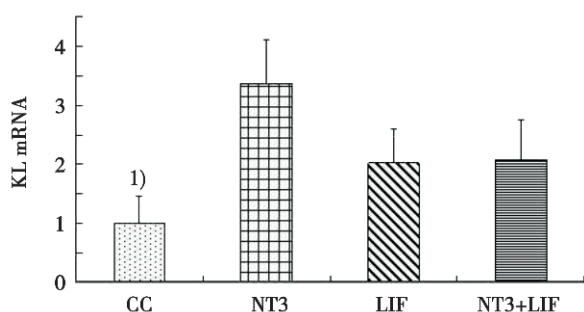
表 6 各处理组培养液中雌二醇水平变化

Table 6 Levels of estradiol in different groups during culture

(pg/mL)

	Day2	Day4	Day6	Day8	Day10	Day12	Day14
CC	61.33 ± 17.24	64.67 ± 6.35	71.67 ± 10.69	68.00 ± 2.83	65.33 ± 12.06	58.33 ± 9.5	66.00 ± 7.81
NT3	56.00 ± 4.24	63.50 ± 7.78	54.00 ± 2.83	56.50 ± 6.36	66.00 ± 8.49	66.00 ± 0.01	62.50 ± 10.61
LIF	67.67 ± 9.87	50.00 ± 3.46	56.33 ± 21.94	63.67 ± 16.86	64.00 ± 16.52	61.00 ± 16.09	63.33 ± 15.57
NT3+LIF	61.67 ± 7.37	61.00 ± 5.00	58.67 ± 9.50	49.0 ± 13.08	53.67 ± 3.06	51.0 ± 8.49	49.67 ± 3.79
<i>P</i> value	0.813	0.065	0.497	0.517	0.642	0.506	0.402

对照组、NT3 组、LIF 组、NT3+LIF 组培养后卵巢中 KL mRNA 的表达量均显著增高($P < 0.05$; 图 5)。



1) $P < 0.05$ vs NT3 group, LIF group and NT3+LIF group

图 5 各组培养后卵巢 KL mRNA 的表达直方图

Fig.5 Expression of KL mRNA response to different treatment

3 讨论

3.1 NT3 对早期卵泡存活、发育及激素合成的影响

本研究显示,NT3 在早期卵泡存活、发育中有促进作用。生物生理代谢的启动过程大多受神经信号调节,卵巢门是卵巢最先接受神经支配的部位,Hirshfield 等^[11]发现靠近卵巢门的原始卵泡最先启动生长,2009 年 Nilsson 等^[12]报道卵巢中存在 NT3 及其受体,提示 NT3 可能是启动卵泡发育的重要因子。我们的研究使用了 TUNEL 凋亡分析,卵巢间质凋亡指数下降。Ojala 等^[13]研究表明在卵巢体外培养中间质细胞是最先死亡的细胞,个别颗粒细胞跟随其后,而卵母细胞维持的时间最长,因此使用 TUNEL 分析间质细胞的凋亡指数是评价 NT3 促进存活的敏感方法。

在卵泡启动发育上,添加 NT3 后卵巢生长卵泡的比例升高,PCNA 表达增强。PCNA 是细胞增殖的有效指标^[14],颗粒细胞的生长、分化是始基卵泡启动生长的关键,有研究^[10]表明颗粒细胞中 PCNA 表达与早期生长分化一致,始基卵泡中 PCNA 基本不表达,在早初级卵泡中,立方颗粒细胞开始出现 PCNA 表达;而从初级卵泡开始的各级生长卵泡中,卵母细胞和颗粒细胞 PCNA 表达明显增加。进一步对生长卵泡进行分级显示,生长中的各级卵泡比例均有明显增高,提示 NT3 不仅可以启动始基卵泡向早初级卵泡的发育,而且

在形成窦卵泡前的整个早期卵泡生长发育阶段均有促进作用。

类固醇激素合成是卵巢功能的重要方面,由卵泡膜细胞和颗粒细胞是在 LH 和 FSH 的作用下共同完成。我们在培养液中可检测到雄烯二酮、雌二醇的分泌,提示新生大鼠卵巢开始具备分泌甾体激素的能力,这与 George 的观察一致。Waraksa 等^[15]观察到在体外添加 NT3 能促进排卵前卵泡雌二醇的分泌。然而,我们实验中雄烯二酮、雌二醇的水平在各个时间点上各组间并无明显差异。这一方面提示 NT3 和 LIF 在早期卵泡发育阶段可能并没有促进激素合成与分泌的作用;另一方面,由于激素合成的能力从次级卵泡才逐渐形成^[16],而我们实验所使用的新生 4 d 乳鼠,卵巢中的大部分卵泡是始基卵泡,卵母细胞周围仅有部分扁平状的前颗粒细胞,FSH 受体尚未形成^[17],此阶段的卵泡并不具备合成激素的能力。因此,体外培养乳鼠卵巢,仅有一小部分已经发育的次级卵泡及窦前卵泡能分泌激素,以致培养液中的激素水平很低,而试剂盒的敏感度可能并不足以有效地检测其之间的差异,这还需进一步的研究证实。

3.2 NT3 促进卵泡启动发育的可能机制

细胞间的信号传导在卵泡发育中非常重要,包括颗粒细胞-卵母细胞、颗粒细胞-颗粒细胞之间的相互作用^[18]。Nission 等^[12]仅在卵母细胞上发现 NT3 的特异性受体 TrkC,而在颗粒细胞和间质细胞并没有观察到 TrkC 的表达。因此推测 NT3 的作用机制除了与卵母细胞上的 TrkC 结合外,也可能与 LIF^[8]、bFGF^[19]等因子促进卵泡发育的机制相似,通过增加其它因子的表达作用于周围的颗粒、间质细胞及卵母细胞,启动始基卵泡的生长。为了探讨 NT3 的可能作用机制,我们检测培养后卵巢组织中 KL mRNA 的表达水平。KL 在卵子发育中的作用已得到公认^[20],通过作用于卵母细胞上的 c-Kit 受体促进原始卵泡启动生长,同时作用于颗粒细胞、卵泡膜细胞及间质细胞,促进其增殖与分化。结果显示,添加 NT3 后卵巢 KL mRNA 的表达上升了 3.38 倍,表明 NT3 促进卵泡生长发育的机制之一可能是通过上调 KL 基因转录表达实现的。在神经系统中,NT3 可通过 Pten/磷脂酰肌醇-3 激酶(Phosphatidylinositol-3'-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(PKB or Akt)信号通路促进早期神经细胞的生长分化^[21]。而有研究发现 NT3 可通过 PI3k/

Akt信号通路抑制细胞凋亡^[22],而在卵泡发育中 PI3k/Akt 信号通路是介导 KL 启动原始卵泡的重要途径^[20]。因此猜测,NT3 可能通过 PI3k/Akt 信号通路影响 KL 的表达。在卵母细胞及其周围的前颗粒细胞、卵泡膜细胞、颗粒细胞和间质细胞的信号传导中,既往研究已发现 bFGF、LIF 和 KL 等因子的相互作用^[23],认为卵泡的发育涉及多种因子之间的参与,共同组成一个复杂的网络,而我们的研究结果提示 NT3 可能是此复杂网络中的一个成员。

3.3 LIF 与 NT3 在卵泡发育中的共同作用探讨

在神经系统,各种神经营养因子(BDNF、NGF、NT3 和 NT4/5)单独或共同作用均能促进神经元的存活与分化。多个研究^[9, 24]显示,LIF 与多种神经营养因子间有明显的协同作用。体外培养螺旋神经节,LIF 可协同 NTs 促进螺旋神经元的再生和存活。而在各种因子的相互作用中,LIF 和 NT3 的协同作用最为明显^[24]。经过多年的研究,人们发现卵巢内始基卵泡的启动发育涉及多种因子的相互作用,而各种因子之间可能存在协同、叠加或拮抗效应。因此,本研究的目的之一是研究 LIF 和 NT3 在始基卵泡启动发育中是否存在协同或叠加作用。结果显示单独添加 LIF 可促进始基卵泡向生长卵泡的转化,并能维持卵泡体外的存活,与 Nobrega 的研究结果一致^[6]。Nilsson 等^[8]研究表明 LIF 促进始基卵泡发育的机制之一是促进 KL mRNA 的表达,我们的实验数据也显示添加 LIF 培养后卵巢 KL mRNA 的表达显著升高。因此推测,LIF 与 NT3 在促进始基卵泡启动发育中存在相似的作用机制,两者共同作用可能会在卵泡发育中产生更强的效应。然而结果显示同时添加两种因子与单独添加 LIF 或 NT3 均能启动始基卵泡生长,但作用效果的差异不明显。这表明,LIF 与 NT3 在促进始基卵泡发育中并无明显的协同或叠加效应。PCR 的结果也支持这一结论,同时添加 LIF 和 NT3 并不能使 KL mRNA 的表达增强更明显。

在神经系统中,LIF 可协同 NT3 促进神经元存活与分化,原因是 LIF 和 NT3 分别作用于不同的神经元细胞,共同作用可产生明显的叠加效应^[24]。而在卵巢中 LIF 和 NT3 可能作用于相同的靶细胞,因此在促进卵泡发育方面,LIF 和 NT3 并不表现出协同或叠加作用。LIF 和 NT3 单独作用均能

增加卵巢组织的 KL mRNA 表达,但两者在此方面是否存在竞争关系尚需要进一步的实验证明。另外,如前所述,NT3 特异性受体 TrkC 基因敲除小鼠中可观察到始基卵泡向初级卵泡的转化^[25];同时也有研究^[26]表明 LIF 基因敲除小鼠卵子能发育成熟并排卵。这提示 LIF 或 NT3 可能都不是始基卵泡发育的必需因子,而是与其它许多因子共同参与促使卵泡的启动生长。卵巢内各种因子间可能存在互补关系,通过旁分泌或自分泌方式起作用。因此,当机体内某一种因子缺乏时,卵泡仍可继续生长发育,这可能是哺乳动物维持繁衍的代偿机制之一^[23]。然而,关于启动始基卵泡发育的具体机制,仍需更多的研究来证实。

参考文献

- [1] FISHEL SB, EDWARDS RG, PURDY JM, et al. Implantation, abortion, and birth after in-vitro fertilization using the natural menstrual cycle or stimulation with clomiphene cit -rate and human menopausal gonadotropin [J]. *J In Vitro Fert Embryo Transf*, 1985, 2(12): 3 - 31.
- [2] POLYZOS NP, DEVROEY P. A systematic review of randomized trials for the treatment of poor ovarian responders: is there any light at the end of the tunnel? [J]. *Fertil Steril*, 2011, 96(5): 1058-1061.
- [3] TARLATZIS BC, ZEPHIRIDIS L, GRIMBIZIS G, et al. Clinical management of low ovarian response to stimulation for IVF: a systematic review [J]. *Hum Reprod Update*, 2003, 9(1): 61 - 76.
- [4] KADOCH IJ, PHILLIPS SJ, BISSONNETTE F. Modified natural -cycle in vitro fertilization should be considered as the first approach in young poor responders [J]. *Fertil Steril*, 2011, 96(5): 1066-1068.
- [5] PAREDES A, ROMERO C, DISSEN GA, et al. TrkB receptors are required for follicular growth and oocyte survival in the mammalian ovary [J]. *Dev Biol*, 2004, 267(2): 430 - 449.
- [6] DA NOBREGA JE JR, GONCALVES PB, CHAVES RN, et al. Leukemia inhibitory factor stimulates the transition of primordial to primary follicle and supports the goat primordial follicle viability in vitro [J]. *Zygote*, 2012, 20(1): 73-78.
- [7] HAIDARI K, SALEHNIA M, REZAZADEH VALOJERDI M. The effect of leukemia inhibitory factor and coculture on the in vitro maturation and ultrastructure of vitrified and non vitrified isolated mouse

- preantral follicles [J]. *Fertil Steril*, 2008, 90 (6): 2389-2397.
- [8] NILSSON EE, KEZELE P, SKINNER MK. Leukemia inhibitory factor (LIF) promotes the primordial to primary follicle transition in rat ovaries [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2002, 188(1-2): 65-73.
- [9] MARZELLA PL, GILLESPIE LN, CLARK GM, et al. The neurotrophins act synergistically with LIF and members of the TGF- β superfamily to promote the survival of spiral ganglia neurons in vitro [J]. *Hear Res*, 1999, 138(1-2): 73-80.
- [10] KUTLUK O, ROBERT SS, JAMES FN. Proliferating cell nuclear antigen marks the initiation of follicular growth in the rat [J]. *Biol Repro*, 1995, 53(2): 295-301.
- [11] HIRSHFIELD A N. Heterogeneity of cell populations that contribute to the formation of primordial follicles in rats [J]. *Biol Reprod*, 1992, 47(3): 466-472.
- [12] NILSSON E, DOLE G, SKINNER MK. Neurotrophin NT3 promotes ovarian primordial to primary follicle transition [J]. *Reproduction*, 2009, 138(4): 697-707.
- [13] OTALA M, ERKKILA K. Cell death and its suppression in human ovarian tissue culture [J]. *Mol Hum Reprod*, 2002, 8(3): 228-236.
- [14] KURKI P, OGATA K, TAN EM. Monoclonal-antibodies to proliferating cell nuclear antigen (PCNA) cyclin as probes for proliferating cells by immunofluorescence microscopy and flow-cytometry [J]. *J Immunol Methods*, 1988, 109(1): 49-59.
- [15] WARAKSA JA, LINDSAY RM, IP NY, et al. Neurotrophin-3 augments steroid secretion by hamster ovarian follicles in vitro [J]. *Zool Sci*, 1995, 12(4): 499-502.
- [16] GAROR R, ABIR R, ERMAN A, et al. Effects of basic fibroblast growth factor on in vitro development of human ovarian primordial follicles [J]. *Fertil Steril*, 2009, 91 (5): 1967-1975.
- [17] CECCONI S, ROSSI G, BARBERI M, et al. Effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide on mouse preantral follicle development in vitro [J]. *Endocrinology*, 2004, 145(4): 2071-2079.
- [18] SEIFER DB, FENG B, SHELDEN RM, et al. Neurotrophin-4/5 and neurotrophin-3 are present within the human ovarian follicle but appear to have different paracrine/autocrine functions [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(10): 4569-4571.
- [19] DISSEN GA, GARCIA-RUDAZ C, OJEDA SR. Role of neurotrophic factors in early ovarian development [J]. *Semin Reprod Med*, 2009, 27(1): 24-31.
- [20] JOHN GB, SHIDLER MJ, BESMER P, et al. Kit signaling via PI3K promotes ovarian follicle maturation but is dispensable for primordial follicle activation [J]. *Dev Biol*, 2009, 331(2): 292-299.
- [21] LIM MS, NAM SH, KIM SJ, et al. Signaling pathways of the early differentiation of neural stem cells by neurotrophin-3 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 357(4): 903-909.
- [22] LI Z, HU Y, ZHU Q, et al. Neurotrophin-3 reduces apoptosis induced by 6-OHDA in PC12 cells through Akt signaling pathway [J]. *Int J Dev Neurosci*, 2008, 26 (6): 635-640.
- [23] ADHIKARI D, LIU K. Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles [J]. *Endocr Rev*, 2009, 30(5): 438-464.
- [24] MARZELLA PL, CLARK GM, SHEPHERD RK, et al. LIF potentiates the NT-3 mediated survival of spiral ganglia neurones in vitro [J]. *Neuroreport*, 1997, 8(7): 1641-1644.
- [25] SPEARS N, MOLINEK MD, ROBINSON LL, et al. The role of neurotrophin receptors in female germ-cell survival in mouse and human [J]. *Development*, 2003, 130(22): 5481-5491.
- [26] STEWART C, KASPAR P, BRUNET L, et al. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor [J]. *Nature*, 1992, 359 (6390): 76-79.

(编辑 徐杰)