

骨形态发生蛋白-4 对人始基卵泡的作用

苏宁¹, 李予², 王文军², 麦美琪², 杨冬梓², 康佳丽¹, 张清学²

(1. 广州市第一人民医院妇产科, 广东 广州 510180; 2. 中山大学附属第二医院生殖中心, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】观察骨形态发生蛋白-4(BMP-4)对人卵巢组织体外培养中始基卵泡存活和生长发育的影响。【方法】34例卵巢组织切成2 mm × 2 mm × 1 mm皮质片,每例标本的皮质片均随机分成3组:研究组(BMP-4组)、对照组和非培养组,培养15 d后行组织学检查、雌孕激素测定和凋亡分析。【结果】培养结束后对照组和研究组始基卵泡比例分别为58% ± 35%和48% ± 40%,低于非培养组(91% ± 9%), $P < 0.05$;窦前卵泡比例分别为52% ± 40%和42% ± 35%,高于非培养组(9% ± 9%), $P < 0.05$ 。研究组间质细胞凋亡指数和培养孕激素浓度分别为(0.16 ± 0.08) μg/L和(3.6 ± 2.0) μg/L,低于对照组,对照组分别为(0.41 ± 0.16) μg/L和(6 ± 4) μg/L($P < 0.05$)。【结论】BMP-4可以促进始基卵泡向窦前卵泡转化,降低细胞凋亡率,抑制孕激素分泌,是卵泡生长发育过程中的促进因子。

关键词: 卵巢组织; 体外培养; 始基卵泡; 骨形态发生蛋白-4; 卵泡发育

中图分类号: R339.22

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2008)06-0676-04

Effect of Bone Morphogenetic Protein-4 on Human Primordial Follicles in Vitro

SU Ning¹, LI Yu², WANG Wen-jun², MAI Mei-qi², YANG Dong-zi², KANG Jia-li¹,
ZHANG Qing-xue²

(1. Department of Gynaecology and Obstetrics, Guangzhou First Municipal People's Hospital, Guangzhou 510180, China; 2. The Center of Reproductive Medicine, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】 To evaluate the effect of bone morphogenetic protein-4 on the survival and development of human primordial follicles in vitro culture. 【Method】 Ovarian tissues from 34 patients were cut into pieces of approximately 2 mm × 2 mm × 1 mm, the pieces from the same patient were randomly distributed to parallel 3 groups, including study group (BMP-4 group), control group, and non-culture group. Histological and apoptosis analysis as well as hormone measurement were performed after 15-day culture. 【Result】 In control group and study group, the percentage of primordial follicles were 58% ± 35% and 48% ± 40% after culture, significantly lower than that in the non-culture group (91% ± 9%), $P < 0.05$. Meanwhile the percentage of preantral follicles in the study group and the control group was 52% ± 40% and 42% ± 35%, respectively, markedly higher than that in the non-culture group (9% ± 9%), $P < 0.05$. The apoptotic index of ovarian interstitial cells and progesterone concentration of culture medium in the study group were (0.16 ± 0.08) μg/L and (3.6 ± 2.0) μg/L, respectively, significantly lower than those in the control group [(0.41 ± 0.16) μg/L and (6 ± 4) μg/L respectively], $P < 0.05$. 【Conclusion】 Our data suggested that BMP-4 could promote the transition of primordial-preantral follicle, decreased cell apoptosis, inhibited the progesterone production and promoted cell survival in vitro. It may be a promoting factor of human follicle development during in vitro culture.

Key words: ovarian tissue; in vitro culture; primordial follicle; bone morphogenetic protein-4; follicle development

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2008, 29(6): 676-679]

收稿日期: 2008-04-01

基金项目: 卫生部临床学科重点项目(2004年); 广州科技局重点科研项目(2004Z1-E0101)

作者简介: 苏宁(1977-), 女, 山东莱芜人, 硕士, 医师; 张清学, 通讯作者, 教授, 硕士生导师, E-mail: zhangqingxue@tom.com

哺乳动物始基卵泡体外生长和成熟的能力在1996年由Eppig和O'Brien首先证实^[1],目前虽在卵泡体外培养途径和培养体系等方面取得了一定进展,并进行了冷冻-解冻后人卵巢组织体外培养的初步研究^[2],但关于始基卵泡生长启动的探索还处于起步阶段。已有动物试验证实骨形态发生蛋白-4(bone morphogenetic protein-4, BMP-4)在体外能促进始基卵泡生长,抑制卵泡凋亡^[3],但尚未见其对人卵泡作用的相关报道。本研究通过向培养液中加入BMP-4观察其对人始基卵泡体外存活和生长发育的影响,探讨其在始基卵泡生长启动中所起的作用。

1 材料与方 法

1.1 病例资料

选取中山大学附属第二医院妇产科2005年5月至11月间进行卵巢手术(包括巧克力囊肿16例、畸胎瘤10例、子宫肌瘤6例和宫颈癌2例)的34例患者作为研究对象,年龄14~38岁,平均30($S=5$ 岁),有规律月经、无内分泌紊乱、无放化疗史、半年内无激素服用史,卵巢囊肿直径 <7 cm。该实验得到中山大学附属第二医院生殖医学伦理委员会的批准,并与患者签署知情同意书。

1.2 实验方法

①将在开腹或腹腔镜下获得的卵巢组织标本立即置于室温保存的HEPES-MEM培养液(Gibco公司)中,冲洗两次后在解剖显微镜下将卵巢组织切成 $2\text{ mm} \times 2\text{ mm} \times 1\text{ mm}$ 的皮质片,每一例患者的卵巢皮质片均随机分为三组:研究组(即BMP-4组)、对照组和非培养组,非培养组是将卵巢皮质片直接放入 40 g/L 甲醛中固定,前两组行体外培养;②卵巢组织体外培养 预先在24孔培养板的培养孔内放入盖有微孔滤膜的不锈钢筛网支架($10\text{ mm} \times 10\text{ mm} \times 3\text{ mm}$),将2~4块卵巢皮质片放置到滤膜上,分为两组在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、体积分数 $5\%\text{CO}_2$ 培养箱中培养15 d,每隔两天更换 $400\text{ }\mu\text{L}$ 培养液,并将更换过的培养液收集到试管中于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存:

对照组:用基本培养液进行培养。基本培养液为: α -MEM(Gibco公司)+ 5 g/L 人白蛋白(德国贝林)+ 1% ITS(胰岛素 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$,转铁蛋白 5.5

$\mu\text{g/mL}$,亚硒酸钠 6.7 ng/mL ,Gibco公司)+抗生素(青霉素 50 U/mL ,硫酸链霉素 $50\text{ }\mu\text{g/mL}$)。研究组:向基本培养液中添加重组人BMP-4(R&D System, Inc.) 100 ng/mL 。

1.3 组织学检查

培养结束后3组卵巢组织标本行组织学检查,切片厚度 $5\text{ }\mu\text{m}$,HE染色后在光镜下阅片,每个标本观察10个高倍镜视野($\times 400$),计数各级卵泡数量并计算所占比例,卵泡计数以卵母细胞核作为标记,根据卵泡形态标准评估卵泡发育阶段^[4]:①始基卵泡:由一个初级卵母细胞及环绕其周围呈单层梭形的前颗粒细胞组成;②窦前卵泡:增大的初级卵母细胞周围包绕单层柱状颗粒细胞即为初级卵泡;增大的初级卵母细胞周围有多层立方状颗粒细胞,即为次级卵泡;③窦状卵泡:颗粒细胞间出现卵泡腔;④排卵前卵泡:即成熟卵泡,卵泡腔增大,卵泡体积显著增大,向卵巢表面突出。

1.4 雌孕激素测定

用德国拜耳公司ACS:180自动化学免疫发光仪测定培养后培养液雌孕激素浓度。

1.5 原位末端标记(TUNEL)分析

培养结束后对照组和BMP-4组标本进行TUNEL分析(试剂盒为In Situ Cell Death Detection Kit-AP,购自德国Roche公司),按照试剂盒说明书进行操作。细胞核内出现明显的弥散性或颗粒性深蓝染色为凋亡阳性细胞,卵母细胞内或/和 $\geq 50\%$ 颗粒细胞出现阳性TUNEL染色为凋亡卵泡^[5],10个高倍视野下($\times 400$)计数卵泡和间质细胞凋亡阳性细胞数,按如下公式计算卵泡凋亡指数(apoptotic index of follicle, AIF)和间质细胞凋亡指数(apoptotic index of interstitial cell, AII)^[6]:卵泡凋亡指数(AIF)=凋亡卵泡数/总卵泡数 $\times 100$;间质细胞凋亡指数(AII)=凋亡间质细胞数/总间质细胞数 $\times 100$ 。

1.6 统计处理方法

用SPSS 11.0统计软件包进行统计分析。数据采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,3组之间每高倍镜视野下卵泡数、始基卵泡和窦前卵泡所占比例、对照组和BMP-4组AIF和AII以及雌孕激素浓度的不同用随机区组化方差分析(randomized complete-block ANOVA)进行统计分析,各组之间两两比较用Tukey HSD法, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 BMP-4 对卵泡生长发育的影响

非培养组、对照组和研究组每高倍镜视野卵泡数无明显差异($F = 0.634, P > 0.05$); 研究组始

基卵泡比例低于对照组($F = 9.8171$), 窦前卵泡比例高于对照组($F = 9.718$), 无统计学差异, $P > 0.05$; 研究组和对照组始基卵泡比例明显低于非培养组(F 值分别为 43.1005 和 33.3824), 窦前卵泡比例明显高于非培养组(F 值分别为 43.100 和 33.382), 均有统计学差异($P < 0.05$; 表 1, 图 1, 2)。

表 1 三组每高倍镜视野下卵泡数、始基卵泡和窦前卵泡比例

Table 1 The total number of follicles, the percentage of primordial and preantral follicles of three groups

	Number of follicles/ high field	Percentage of primordial follicle	Percentage of preantral follicle
Non-culture group($n = 34$)	4 ± 4	$91 \pm 9^{1)}$	$9 \pm 9^{1)}$
Control group($n = 34$)	3 ± 3	58 ± 35	42 ± 35
Study group($n = 34$)	3.4 ± 2.4	48 ± 40	52 ± 40
<i>P</i>	> 0.05	< 0.05	< 0.05

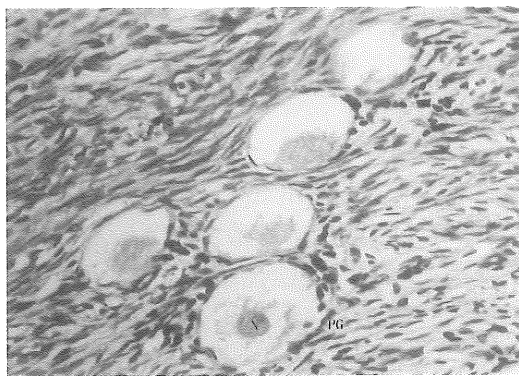


图 1 始基卵泡

Fig.1 Primordial follicles

consist of a primary oocyte surrounded by a single layer of flattened squamous pregranulosa cells, HE, $\times 400$

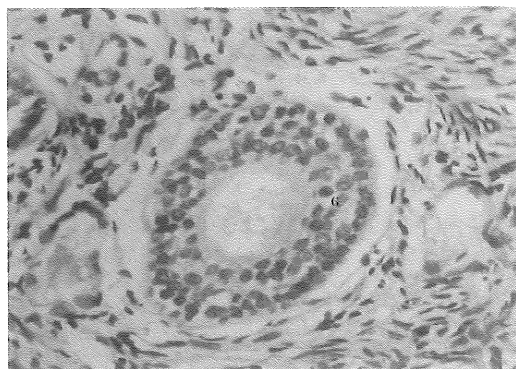


图 2 窦前卵泡

Fig.2 Preantral follicle

contains cuboidal granulosa cells in layers around the enlarged primary oocyte, HE, $\times 400$

2.2 BMP-4 对基础雌孕激素分泌的影响

培养结束后培养液雌二醇浓度研究组低于对

照组, 无统计学差异, $P > 0.05$; 孕激素浓度研究组显著低于对照组($P < 0.05$; 表 2)。

表 2 对照组和研究组雌孕激素浓度

Table 2 The estradiol and progesterone concentration of the control and the study group

	Estradiol concentration (ng/L)	Progesterone concentration ($\mu\text{g/L}$)
Control group	1348 ± 738	6 ± 4
Study group	947 ± 476	3.6 ± 2.0
<i>F</i>	0.805	8.521
<i>P</i>	> 0.05	< 0.05

2.3 BMP-4 对卵泡和间质细胞存活的影响

TUNEL 分析中对照组和研究组均未发现卵泡凋亡, 研究组间质细胞凋亡指数为 0.16 ± 0.08 , 显著低于对照组的 0.41 ± 0.16 ($F = 13.113, P < 0.05$)。

3 讨论

骨形态发生蛋白是转移生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 超家族中最大的一个家族, 是卵巢内调节系统的重要组成成员, 其中 BMP-4 在哺乳动物卵巢中的功能也有实验报道^[7], 目前认为 BMP-4 在卵巢组织内通过局部信号传导系统调节卵泡的生长发育、存活以及雌孕激素分泌。

3.1 BMP-4 对卵泡生长发育的影响

本研究显示, 人卵巢组织皮质片在体外培养

过程中加入 BMP-4 后始基卵泡比例明显下降,而窦前卵泡比例明显升高,与 Nilsson 等的动物实验结论相一致^[3],说明 BMP-4 可能具有促进体外培养过程中人始基卵泡向窦前卵泡转化以及生长发育的作用,是调节人原始-窦前卵泡转化和早期卵泡生长的促进因子。虽然与非培养组相比,对照组培养结束后始基卵泡的比例也是下降的,窦前卵泡的比例也是升高的,但变化幅度不及 BMP-4 组明显,如能适当延长体外培养时间,BMP-4 将可能充分发挥其促进始基卵泡体外转化和生长的作用,这将为实现人类从始基卵泡培养到可供移植胚胎的完全体外操作提供更多机会。

3.2 BMP-4 对卵泡雌孕激素基础分泌的影响

动物实验表明 BMP-4 可以在提高 FSH 诱导颗粒细胞分泌雌二醇的同时抑制孕激素的分泌,并能降低在没有 FSH 诱导情况下的孕激素分泌,即孕激素的基础分泌^[3,8],而且与激活素(activin)、促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH)相互作用调节促性腺激素(gonadotropin, Gn)的分泌^[9]。本研究显示,与对照组相比,BMP-4 组培养结束后培养液中雌二醇的含量略有下降,但无统计学意义,因此还不能确定其对颗粒细胞无 FSH 诱导时雌二醇分泌的确切作用;但是,培养后孕激素含量明显降低,说明 BMP-4 同样可以降低颗粒细胞孕激素的基础分泌,延缓颗粒细胞的黄素化,有利于对其进行下一步的体外操作和研究。

3.3 BMP-4 对卵巢细胞存活的影响

有动物实验向培养液中加入 BMP-4 中和抗体后发现,卵巢细胞减少的同时凋亡细胞相应增加,同时伴有卵巢体积缩小和正常形态的丧失^[2],体内实验也得出相似结果^[10]。在本实验中,与对照组相比,研究组卵泡数有增多的趋势,推测 BMP-4 可能有助于改善卵泡的体外存活,减少卵泡丢失。由于凋亡过程发生的瞬间性和实验标本的数量限制,在 TUNEL 分析中两组均未发现凋亡卵泡,但 BMP-4 组间质细胞的凋亡数量明显少于对照组,提示 BMP-4 有利于提高人卵巢组织体外培养过程中细胞的存活能力,减少细胞丢失,对维持卵巢组织结构和功能的完整性有重要作用。

综上所述,通过本实验我们发现,在人类卵巢皮质体外培养过程中,加入重组人类 BMP-4 可以显著促进始基卵泡向窦前的转化和生长,降低颗粒细胞孕激素的基础分泌,延缓其黄素化,降低卵巢组织中间质细胞的凋亡,提高卵巢细胞体外存活能力,可能是卵泡生长发育过程中的促进因子。

参考文献:

- [1] Eppig JJ, O'Brien MJ. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles [J]. *Biol Reprod*, 1996, 54(1):197-207.
- [2] 李宇彬,周灿权,杨国奋,等.人卵巢组织两种超低温冻存方法的研究[J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2006, 27(6):704-708.
- [3] Nilsson EE, Skinner MK. Bone Morphogenetic Protein-4 Acts as an Ovarian Follicle Survival Factor and Promotes Primordial Follicle Development [J]. *Biol Reprod*, 2003, 69(4):1265-1272.
- [4] 乐杰. 妇产科学 [M]. 7 版. 北京:人民卫生出版社, 2008:10-25.
- [5] Depalo R, Nappi L, Loverre G, et al. Evidence of apoptosis in human primordial and primary follicles [J]. *Hum Reprod*, 2003, 18(12):2678-2682.
- [6] Hockel M, Schlenger K, Hockel S, et al. Hypoxic cervical cancers with low apoptotic index are highly aggressive [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(18):4525-4528.
- [7] Shimasaki S, Zachow RJ, Li D, et al. A functional bone morphogenetic protein system in the ovary [J]. *Cell Biol*, 1999, 96(13):7282-7287.
- [8] Pierre A, Pisselet C, Dupont J, et al. Molecular basis of bone morphogenetic protein-4 inhibitory action on progesterone secretion by ovine granulosa cells [J]. *Mol Endocrinol*, 2004, 33(3):805-817.
- [9] Nicol L, Faure MO, McNeilly JR, et al. Bone morphogenetic protein-4 interacts with activin and GnRH to modulate gonadotrophin secretion in LbetaT2 gonadotrophs [J]. *J Endocrinol*, 2008, 196(3):497-507.
- [10] Tanwar PS, O'shea T, McFarlane JR. In vivo evidence of role of bone morphogenetic protein-4 in the mouse ovary [J]. *Anim Reprod Sci*, 2008, 106(3/4):232-240.

(编辑 张恩健)