

小鼠体外发育与体内发育成熟卵子胞浆成熟度和细胞骨架比较

彭宇洪¹, 庄广伦¹, 陈文芳², 李涛¹, 周灿权¹

(中山大学附属第一医院 1. 生殖中心, 2. 肾内科, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】体外培养小鼠窦前卵泡得到成熟卵子, 比较其与体内发育成熟卵子直径、谷胱甘肽含量、皮质颗粒分布以及纺锤体结构的差异, 评估胞浆成熟度对卵子发育潜能的影响。【方法】选择出生 10 d 小鼠, 分离窦前卵泡, 培养后得到 326 个 M II 期卵子作为体外发育组。8~10 周雌鼠经孕马血清和绒毛膜促性腺激素注射得到 244 个 M II 卵子作为体内发育组。酶法检测卵子谷胱甘肽含量, 免疫荧光染色, 共聚焦显微镜成像显示纺锤体形态和皮质颗粒分布。【结果】体外发育成熟卵子直径(69.6±5.7)μm, 明显小于体内发育成熟卵子直径(84.2±3.0)μm; 体外发育成熟卵子谷胱甘肽含量(4.3±0.7)pmol 明显低于体内发育成熟卵子(6.1±1.0)pmol; 50 个体外发育成熟卵子中 18 个(36%)皮质颗粒周边分布, 40 个体内发育成熟卵子中 36 个(90%)皮质颗粒周边分布($P < 0.05$); 14 个(28%)体外发育卵子出现无皮质颗粒区, 34 个(85%)体内发育成熟卵子出现无皮质颗粒区($P < 0.05$); 120 个体外发育成熟卵子中 46 个(38.3%)显示正常桶状纺锤体, 84 个体内发育成熟卵子中 80 个(95.2%)显示正常桶状纺锤体($P < 0.05$)。【结论】体外发育成熟卵子胞浆成熟度没有达到体内发育成熟卵子水平。

关键词: 卵泡; 组织培养; 微管蛋白; 皮质颗粒; 谷胱甘肽

中图分类号: Q954.43

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2005)03-0304-04

Ooplasm Maturation and Cytoskeleton Are Less Optimum in Oocytes from *In Vitro* Growth Follicles

PENG Yu-hong¹, ZHUANG Guang-lun¹, CHEN Wen-fang², LI Tao¹, ZHOU Can-quan¹

(1. Department of Assisted Reproduction Center, 2. Department of Nephrology, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To acquire mature oocytes from *in vitro* preantrum follicles and compare the oocyte diameter, glutathione content, cortical granulae distribution and spindle appearance between *in vitro* growth oocytes and *in vivo* growth oocytes so as to evaluate ooplasm maturation's effect on oocyte competence. 【Methods】10-day-old mouse pre-antrum follicles were cultured in medium drops; To stain the acquired MII oocytes with fluorescence conjugated α -tubulin antibody and lectin. To image the spindles and cortical granulae with confocal microscope; To detect glutathione content by enzyme method. 【Results】A total of 326 oocytes was acquired after *in vitro* culture; The diameter of *in vitro* growth oocytes was 69.6±5.7 μm, which was significantly smaller than that of *in vivo* growth oocytes 84.2±3.0 μm; The glutathione content of *in vitro* growth oocytes and *in vivo* growth oocytes was 4.3±0.7 pmol and 6.1±1.0 pmol respectively (the difference was significant); 18/50 of *in vitro* growth oocytes and 36/40 of *in vivo* growth oocytes formed cortical granulae monolayer ring, and 14/50 of *in vitro* growth oocytes and 34/40 of *in vivo* growth oocytes formed cortical granule-free domain, difference was significant; 46/120 of *in vitro* growth oocytes and 80/84 of *in vivo* growth oocytes formed barrel-shaped spindle (the difference was significant). 【Conclusion】MII oocytes achieved from *in vitro* culture of mouse pre-antrum follicles bears less optimum ooplasm maturation. To a certain extent, the oocyte cytoskeleton is abnormal.

Key words: ovarian follicle; tissue culture; tubulin; cortical granule; glutathione

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2005, 26(3): 304-307]

收稿日期: 2004-11-01

基金项目: 广东省科技攻关基金资助项目(2003A3020305)

作者简介: 彭宇洪(1970-), 女, 湖北荆门人, 博士生, 主治医师. E-mail: pyhlucy@yahoo.com.cn

卵子核成熟的特征是生殖泡破裂、极体排出,卵浆成熟的表现更复杂,可以用皮质颗粒迁移和谷胱甘肽(glutathione GSH)水平衡量。啮齿类动物不成熟卵子皮质颗粒均匀分布于胞浆,成熟过程中向细胞周边移动,直至形成细胞膜下单层皮质颗粒,在纺锤体分布的区域出现无皮质颗粒区域(cortical granules free domain CGFD)^[1]。卵浆中GSH的含量随着接近排卵逐渐增加^[2],MII卵子GSH含量是胞浆成熟的重要指标之一。体外培养窦前卵泡可以得到成熟卵子,但是体外发育成熟卵子受精后得到囊胚的比例始终很低^[3],原因不清楚。Hu等^[4]发现体外发育成熟卵子的纺锤体结构有小的变化,Rodriguez等^[5]发现体外成熟的卵子GSH含量高于不成熟卵子,但是体外发育成熟卵子GSH水平目前并不清楚。为初步探讨影响体外发育成熟卵子发育潜能的因素,本实验结合卵子直径、皮质颗粒分布、GSH含量评估卵子胞浆成熟度,同时研究细胞骨架改变,分析这些因素特别是胞浆成熟度与体外发育成熟卵子发育潜能的相关性。

1 材料与方 法

1.1 动物与试剂

出生10 d雌性昆明小鼠50只,10~12周雌性昆明小鼠20只,购自中山大学北校区实验动物中心。重组人促性腺激素(Serono公司);鼠 α -微管蛋白单克隆抗体(Santa Cruz公司);Hoechst33258、FITC conjugated Lectin、NADPH、5'5'-Dithiobis(Sigma公司);胰岛素、转铁蛋白、硒、 α -MEM、胎牛血清、Fetuin(Gibco公司)

1.2 方 法

1.2.1 小鼠体外发育成熟卵子 出生10 d小鼠经颈椎脱臼处死,取出卵巢,培养液洗涤3次,1 mL注射器25G针头机械分离出单个卵泡。选择基底膜完整,形态好,颗粒细胞层2~4层,直径85~110 μ m的窦前卵泡进行培养。培养液: α -MEM加入5 mg/L胰岛素、2.75 mg/L转铁蛋白、2.8 μ g/L硒,100 mL/L胎牛血清,100 U/L重组人促性腺激素,1 g/L fetuin,100 000 U/L青霉素,100 mg/L链霉素。Falcon 3001培养皿中做20 μ L液滴,每个皿10个液滴,矿物油覆盖。2~4个卵泡移入1个液滴,37 $^{\circ}$ C,5% CO₂,100%湿度培养12 d,隔天换液

10 μ L,每日倒置显微镜观察卵泡形态,目镜标尺测量卵泡和卵子的直径。第12天加入25 000 U/L人绒毛膜促性腺激素,14~16 h后收集游出卵子。

1.2.2 小鼠体内发育成熟卵子 选择8~12周雌性昆明小鼠,于发情后期腹腔注射孕马血清5 U,48 h后腹腔注射人绒毛膜促性腺激素5 IU,16 h后处死小鼠,取出子宫输卵管,挑破输卵管膨大部位,得到卵丘复合物(cumulus oocyte complex COC),用1 g/L透明质酸酶消化30 s后得到MII卵子。

1.2.3 免疫荧光染色 用4 g/L pronase消化卵子2 min,去掉透明带后,40 g/L多聚甲醛固定30 min,PBS+4 g/L牛血清白蛋白洗3次,200 mL/L TritonX-100固定20 min,PBS+4 g/L牛血清白蛋白洗3次,50 mL/L Tween 20孵育2 h,加入 α -微管蛋白抗体1:100于4 $^{\circ}$ C过夜,PBS+4 g/L牛血清白蛋白洗3次,加入标记FITC羊抗鼠IgG抗体1:32孵育2 h,PBS+4 g/L牛血清白蛋白洗3次,加入5 mg/L Hoechst33258约8 min后PBS+4 g/L牛血清白蛋白洗3次,滴入甘油和PBS混合液(1:1),盖片。

固定方法同上,加入100 mg/L标记FITC lectin,染色30 min,PBS+4 g/L牛血清白蛋白洗3次,同法盖片。

共聚焦显微镜观察纺锤体、染色体和皮质颗粒图像后,测量纺锤体的长度和宽度。

1.2.4 谷胱甘肽测定 用1 g/L透明质酸酶消化30 s后,PBS洗涤3次;30~40个卵子加入0.2 mol/L NaH₂PO₄+10 mmol/L Na₄EDTA 5 μ L,加入5 μ L 1.25 mol/L H₃PO₄, -80 $^{\circ}$ C保存。冻融后反复吹打。依次加入700 μ L 0.33 mg/L NADPH,100 μ L 6 mmol/L 5'5'-dithio-bis,190 μ L蒸馏水,10 μ L 250 IU/mL GSH reductase,反应15 min,用紫外分光光度仪412 nm波长测定吸光度。标准品0.02 mmol/L,0.1 mmol/L,0.2 mmol/L,1 mmol/L GSH同上法制成标准曲线,根据标准曲线得到GSH浓度。

1.3 统计学处理

使用SPSS 10.0软件进行 t 检验和 χ^2 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 窦前卵泡培养后直径增加

机械分离的卵泡有1~2层立方形颗粒细胞包

绕卵子,基底膜完整(见图 1A);体外培养过程中,颗粒细胞增殖,细胞层数增加,卵泡增大,部分卵泡出现卵子周围窦泡样结构(见图 1B)。测量 52 个机械分离的窦前卵泡直径(91.2 ± 9.4) μm ,培养 12 d 后达到 (158.6 ± 33.9) μm ($P < 0.01$)。卵子直径 (53.1 ± 5.8) μm ,培养后卵子直径 (69.6 ± 5.7) μm ($P < 0.01$)。

2.2 体外发育成熟卵子直径小于体外发育成熟卵子

体外培养得到 326 个成熟卵子,测量其中 52 个卵子直径,同时测量 45 个体内发育成熟卵子直径。体内成熟卵子直径 (84.2 ± 3.0) μm ,体外成熟卵子 (69.6 ± 5.7) μm ($P < 0.01$)。体内成熟卵子大小一致,细胞浆清亮、均匀,极体大小一致;体外成熟卵子细胞浆略暗,有少量不均匀斑块,极体大小不太一致(见图 1C)。



图 1 小鼠窦前卵泡体外培养得到 MII 卵子

Fig.1 MII oocyte acquired from *in vitro* culture of mouse pre-antrum follicles

A: Mouse pre-antrum follicles with 2-4 layers of granule cells ($\times 200$); B: Antrum-like structure formed ($\times 200$); C: MII oocytes ($\times 400$)

2.3 体外发育成熟卵子 GSH 含量低于体内发育成熟卵子

用标准品作出 GSH 浓度-吸光度标准曲线,根据吸光度测定每组卵子 GSH 浓度,每个卵子 GSH 含量(pmol)=浓度(mmol/L) \times 体积(μL)/卵子数目。156 个体外发育成熟卵子分成 5 组,每组 30~40 个卵子;120 个体内发育成熟卵子分成 4 组,每组 30 个卵子。结果体外发育成熟卵子 GSH 含量 (4.3 ± 0.7) $\text{pmol}/\text{oocyte}$,体内发育成熟卵子 GSH 含量 (6.1 ± 1.0) $\text{pmol}/\text{oocyte}$ ($P < 0.05$)。

2.4 体外发育成熟卵子皮质颗粒分布与体内发育成熟卵子不同

不成熟 GV 期卵子皮质颗粒均匀分布(见图 2A),发育成熟后皮质颗粒单层分布于细胞膜下,并出现一片无皮质颗粒区(见图 2C)。40 个体内发育成熟卵子中 36 个(90%)卵子皮质颗粒周边分布,34 个(85%)卵子出现无皮质颗粒区;50 个体外发育成熟卵子中,18 个(36%)卵子皮质颗粒周边分布,14 个(28%)卵子出现无皮质颗粒区 ($P <$

0.05)(见图 2B、图 2C)。

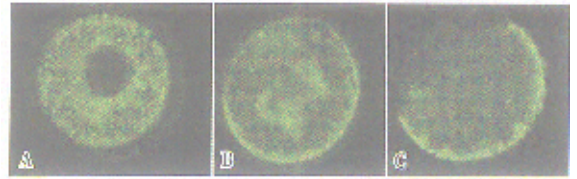


图 2 不同成熟阶段皮质颗粒分布

Fig.2 Cortical granule distribution in different matured oocytes

A: Cortical granules distribute uniformly in GV oocyte with vacancy at the site of GV ($\times 400$); B: Cortical granules form a monolayer ring in *in vitro* growth oocyte ($\times 400$); C: Cortical granules form a monolayer ring in *in vivo* growth oocyte with obvious CGFD ($\times 400$)

2.5 体外发育成熟卵子正常纺锤体形成比例低

84 个体内发育成熟的卵子中 80 个(95.2%)具有典型的纺锤体形状,结构紧密,两侧对称,纵轴与细胞膜平行(见图 3A);120 个体外培养的 M II 卵子 46 个(38.3%)显示纺锤体,明显少于体内发育成熟卵子 ($P < 0.01$)。体内发育成熟的卵子纺锤体长/宽比值 1.2 ± 0.4 ,体外培养的 M II 卵子纺锤体形状更细长,长/宽比值 2.1 ± 0.7 ($P < 0.05$)(见图 3B)。其余 62 个(51.7%)体外培养成熟卵子显示微管蛋白排列不规则,没有形成典型纺锤体样结构(见图 3C)。

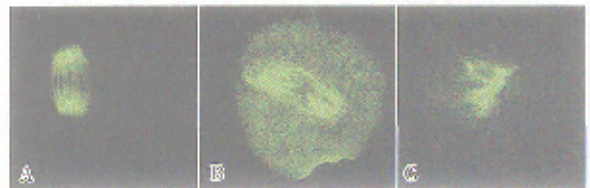


图 3 不同卵子纺锤体成像

Fig.3 Spindle images in different oocytes

A: *In vivo* growth oocyte shows barrel-like spindle ($\times 400$); B: *In vitro* growth oocyte shows longer spindle ($\times 400$); C: *In vitro* growth oocyte shows abnormal appearance of spindle ($\times 400$)

3 讨论

3.1 GSH 含量低可能是体外发育成熟卵子发育潜能低的原因之一

本实验中体外发育成熟卵子直径小,GSH 含量低,皮质颗粒迁移异常,CGFD 形成率低,表明体外发育卵子胞浆成熟度低。GSH 有助于卵子受精时雄原核的发育,改善种植前胚胎^[5];GSH 水平低的卵子发育潜能低^[6]。另一方面,GSH 可能通过

调节微管蛋白聚合影响发育潜能。GSH 显著增加的阶段正是卵子纺锤体开始形成的阶段^[7],如果使用氧化剂破坏 GSH, 卵子内纺锤体微管蛋白也被破坏,形成多个异常雌原核,发生非整倍体^[8]。本实验显示体外发育成熟卵子 GSH 明显低于体内发育成熟卵子,同时,体外发育成熟卵子纺锤体结构比较不紧密,更细长,部分卵子微管蛋白聚合杂乱,没有形成典型的纺锤体结构。推测体外发育成熟卵子内低水平的 GSH 不能缓冲氧自由基的损害,雄原核不能正常形成;同时,卵子胞浆内氧化压力上升可能造成部分微管蛋白破坏,细胞骨架异常使卵子不能正常受精、卵裂。因此,GSH 合成是卵子成熟过程中极为重要的环节,也是决定卵子发育潜能的重要因素。

3.2 皮质颗粒迁移障碍反映卵子细胞骨架异常

皮质颗粒迁移是评价哺乳动物卵子胞浆成熟标准。皮质迁移的动因目前还不明确,多数人认为微丝支持皮质颗粒迁移。如果卵子成熟过程中抑制微丝聚合,皮质颗粒就不会移向细胞周边^[9];抑制微管合成后,皮质颗粒不能形成完整的单层,而是片状附着于细胞膜下,不能分泌^[10]。因此细胞骨架与皮质颗粒迁移密切相关。CGFD 是否出现由染色体或染色体相关物质主导,与完整的染色质有直接关联^[11]。本实验见体外发育成熟卵子皮质颗粒周边分布比例低,而且 CGFD 形成比例低,从一个侧面提示体外发育成熟卵子细胞骨架异常。异常的微丝、微管不能正确引导皮质颗粒迁移,同时纺锤体结构异常引起染色体分散可能使 CGFD 出现率低。

总之,体外发育成熟卵子在胞浆成熟度和细胞骨架两方面都存在缺陷。小鼠窦前卵泡体外培养过程中,卵子生长发育依赖颗粒细胞提供营养物质和生长因子。体外培养环境下,卵子合成蛋白可能出现异常,细胞内 GSH 水平明显下降就是变化之一。低水平 GSH 可能降低卵子缓冲氧自由基的能力,损害细胞骨架系统,微管蛋白聚合障碍。细胞骨架异常一方面改变皮质颗粒的分布,另一方面影响染色体规则排列,继而减少 CGFD 出现。所以,卵子胞浆成熟不仅直接影响卵子发育潜能,而且通过细胞骨架系统进一步影响卵子。优化培养体系,特别是改善颗粒细胞活性可能是提高卵子发育潜能的一条途径。

参考文献:

- Precocious loss of cortical granules during mouse oocyte meiotic maturation and correlation with egg-induced modification of the zona pellucida[J]. *Dev Biol*, 1990, 137(1):46-55.
- [2] Gasparrini B, Sayoud H, Neglia G, *et al.* Glutathione synthesis during *in vitro* maturation of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effects of cysteamine on embryo development[J]. *Theriogenology*, 2003, 60(5):943-52.
- [3] O'Brien MJ, Pendola JK, Eppig JJ. A revised protocol for *in vitro* development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their developmental competence[J]. *Biol Reprod*, 2003, 68(5):1682-6.
- [4] Hu Y, Betzendahl I, Cortvrintd R, *et al.* Effects of low O₂ and ageing on spindles and chromosomes in mouse oocytes from pre-antral follicle culture[J]. *Hum Reprod*, 2001, 16(4):737-48.
- [5] Mayor P, Lopez-Bejar M, Rodriguez-Gonzalez E, *et al.* Effects of the addition of glutathione during maturation on *in vitro* fertilisation of prepubertal goat oocytes [J]. *Zygote*, 2001, 9(4):323-30.
- [6] Rodriguez-Gonzalez E, Lopez-Bejar M, Mertens MJ, *et al.* Effect on *in vitro* embryo development and intracellular glutathione content of the presence of thiol compounds during maturation of prepubertal goat oocytes[J]. *Mol Reprod Dev*, 2003, 65(4):446-53.
- [7] Zuelke KA, Jeffay SC, Zucker RM, *et al.* Glutathione concentration vary with the cell cycle in maturing hamster oocytes, zygotes, and preimplantation stage embryos[J]. *Mol Reprod Dev*, 2003, 64(1):106-12.
- [8] Zuelke KA, Jones DP, Perreault SD. Glutathione oxidation is associated with altered microtubule function and disrupted fertilization in mature hamster oocytes[J]. *Biol Reprod*, 1997, 57(6):1413-9.
- [9] Connors SA, Kanatsu-Shinohara M, Schultz RM, *et al.* Involvement of the cytoskeleton in the movement of cortical granules during oocyte maturation and cortical granule anchoring in mouse eggs [J]. *Dev Biol*, 1998, 200(1):103-5.
- [10] Wessel GM, Conner SD, Berg L. Cortical granule translocation is microfilament mediated and linked to meiotic maturation in the sea urchin oocyte [J]. *Development*, 2002, 129(18):4315-25.
- [11] Deng MQ, Kishikawa H, Yanagimachi R, *et al.* Chromatin-mediated cortical granule redistribution is responsible for the formation of the cortical granule-free domain in mouse eggs[J]. *Dev Biol*, 2003, 257(1):166-76.

[1] Ducibella T, Kurasawa S, Rangarajan S, *et al.*

(编辑 张恩健)