

## 小鼠卵母细胞体外自发成熟与成熟抑制的研究<sup>①</sup>

陈勇<sup>②</sup> 夏国良 苏友强 傅国栋

(中国农业大学生物学院)

**摘要** 本实验建立了昆明白小鼠卵丘-卵母细胞复合体(CEO)、自然裸卵(NO)和裸卵(DO)3种细胞模型,并观察其在体外培养时卵母细胞的成熟情况。3种细胞模型在M199培养液中自发成熟时,其卵母细胞生发泡破裂(GVBD)主要发生在培养后1~5 h。培养至24 h,CEO、DO和NO的GVBD发生率分别为97.3%,87.3%和81.2%,CEO和NO间GVBD%差异显著( $P < 0.05$ )。CEO中卵母细胞的第一极体(PB1)主要集中在8~14 h排出(24 h时,PB1%为86.6%),DO主要在10~16 h排出PB1(24 h时,71.7%),而NO在培养24 h内很少有PB1排出(17.4%)。4 mmol·L<sup>-1</sup>次黄嘌呤(HX)能显著抑制体外培养的CEO、NO和DO的GVBD发生和PB1的排出。当卵母细胞从有腔卵泡释放入不含HX的环境,然后再放入含HX的环境时,不可逆地启动了一部分卵母细胞减数分裂的恢复。说明:①卵丘细胞对卵母细胞GVBD的发生和PB1的排出有促进作用;②HX可以抑制卵母细胞体外成熟。

**关键词** 昆明白小鼠; 卵母细胞; 体外培养; 次黄嘌呤(HX)

**分类号** Q942.5

## Studies on the Mouse Oocyte Spontaneous Maturation and Resumption Inhibition *in vitro*

Chen Yong Xia Guoliang Su Youqiang Fu Guodong  
(College of Biology, CAU)

**Abstract** The present works are conducted to establish the mouse oocyte models of Kunming white mouse oocyte, and study the mechanism of oocyte spontaneous maturation and inhibition. When CEO, NO and DO were cultured in Medium 199, the oocytes underwent germinal vesicular breakdown (GVBD) mainly within 1~5 h. By 24 h of culture, the GVBD percentage of CEO, NO and DO were 97.3%, 87.3% and 81.2%, respectively. The first polar body (PB1) of CEO and DO were respectively extruded within 8~14 h and 10~16 h. Moreover, the PB1 percentage of CEO (86.6%) was higher than that of DO (71.7%). Whereas PB1 extrusion of NO was not observed within 24 h of culturing. 4 mmol·L<sup>-1</sup> hypoxanthine (HX) showed a significant inhibitory effect on oocyte maturation of CEO, NO and DO. When the CEO were released into non-HX medium priming for 30~60 min, and then transferred into a new HX medium for a further time. The HX could not inhibit the resumption completely. Our results indicate that ① cumulus cells play a role of inducing oocyte maturation; ② HX shows an inhibitory effect on oocyte maturation *in vitro*.

**Key words** Kunming white mouse; oocyte culture *in vitro*; hypoxanthine (HX)

收稿日期: 1998-03-17

①此项目由国家教委回国人员启动基金资助

②陈勇,北京圆明园西路2号(中国农业大学内)农业部饲料工业中心,100094

自从 1935 年 Pincus 和 Enzmann 发现将兔的有腔卵泡中的卵母细胞分离出来并在体外培养时可以自发成熟这一事实以来,人们在卵母细胞体外成熟方面作了大量的研究工作。已成功地从多种哺乳动物有腔卵泡中释放出 CEO,然后在体外培养条件下使其成熟。这种方法获得的成熟卵母细胞可以受精及完成其后的一系列发育<sup>[1]</sup>。通过去除 CEO 的卵丘细胞获得的 DO,在体外自发成熟后同样可以受精及完成其后的发育<sup>[2]</sup>。从腔前卵泡通过卵泡成熟培养可以获得能够在体外自发成熟的 CEO 或 DO<sup>[3]</sup>。以上都是研究卵母细胞成熟及其调控机制的有效细胞模型。但一般认为,从卵泡中释放出来的自然裸卵(NO)发生 GVBD 后很少排出第一极体,即细胞质不能成熟<sup>[4]</sup>。

近年来,国内外学者在卵母细胞成熟方面的研究很多,并得到不少有意义的结果,但系统地研究昆明小白鼠的各种卵母细胞培养模型的工作较少。昆明小白鼠是我国自己培育的一种很好的实验动物,对其卵母细胞成熟的研究,无论在科研实践或经济效益方面都具有重要的意义。本研究旨在建立昆明小白鼠的 CEO,NO 和 DO3 种卵母细胞体外培养模型,为进一步研究卵母细胞体外成熟的调控机制奠定一定的基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

M199 培养基、丙酮酸钠、次黄嘌呤(HX)购自 GIBCO 公司,牛血清白蛋白 V 片断(BSA)、谷氨酰胺为 SIGMA 公司产品,孕马血清促性腺激素(PMSG)购自中国农科院畜牧所。

### 1.2 方 法

**1.2.1 实验动物** 24~28 日龄的未性成熟雌性昆明小白鼠,体重 15~18 g,购自中国科学院遗传所实验动物中心。处死前 46~48 h 腹腔注射 PMSG 6 IU/0.1 mL·只<sup>-1</sup>。

**1.2.2 卵母细胞的获取** PMSG 处理后 46~48 h,颈椎脱臼法处死小鼠,取出卵巢置于 37 C 的 4 mmol·L<sup>-1</sup>HX 培养液(本文中,加 HX 的培养液均简称 HX 培养液)中。体视显微镜下用 5  $\frac{1}{2}$  号针头穿刺有腔卵泡,释放出卵丘-卵母细胞复合体(CEO)、自然裸卵母细胞(NO)。拣出的卵母细胞在 37 C 的 4 mmol·L<sup>-1</sup>HX 培养液中漂洗 3 次备用。选择外围紧紧包着 2~3 层卵丘细胞且均匀一致的卵丘-卵母细胞复合体(cumulus cell-enclosed oocyte, CEO)。从卵泡中释放出来时完全裸露的卵母细胞称为自然裸卵(naked oocyte, NO)。机械法脱去 CEO 的卵丘细胞而得到的卵母细胞称为裸卵(denuded oocyte, DO)。

**1.2.3 卵母细胞培养** 在 4 孔培养板(Nunc 公司)每孔加入 490  $\mu$ L 培养液,将漂洗干净的卵母细胞移入培养板中,每孔 20 个卵母细胞,培养在 38 C、5%CO<sub>2</sub>、95%空气、100%湿度的培养箱中。实验所用的激素及其他因子均在临近细胞培养时才加入,并保持每孔培养液总体积在 (500 $\pm$ 5) $\mu$ L。

**1.2.4 卵母细胞成熟** 本实验以生发泡破裂(germinal vesical breakdown, GVBD)作为细胞核成熟的标志,以第一极体(polar body, PB1)排出代表细胞质成熟。检查时,对于 NO 或 DO 可以通过倒置显微镜直接观察;对于 CEO,则需要用口径等于或略大于卵母细胞直径的吸管反复吹吸去掉外围卵丘细胞后再判断。

**1.2.5 数据统计** 采用 t 检验进行统计分析。每个实验至少重复 3 次。

## 2 结果

### 2.1 CEO,NO 及 DO 在体外自发成熟

CEO,NO 及 DO 分别培养在 M199 培养液中,每隔 1~2 h 观察统计 GVBD 及 PB1 排出的百分率,直至 24 h,结果见图 1,2。由图 1 可知,CEO,NO 及 DO 在 M199 培养液中自发成熟时,其 GVBD 的发生主要集中在培养后 1~5 h。至 5 h,GVBD 数占 24 h GVBD 总数的 90% 以上。各个时间点的 GVBD 发生率,NO 明显低于 CEO(3 h 时,GVBD% 分别为 63.9% 和 80.8%;24 h 时,GVBD% 为 81.2% 和 97.3%)。DO 与 CEO 的 GVBD% 差异不显著(24 h,分别为 87.3% 和 97.3%),但 DO 却比 CEO 成熟更快(2 h 时,GVBD% 分别为 63.9% 和 52.9%)。

由图 2 可知,CEO 在 M199 培养液中 8 h 开始有 PB1 排出,14 h 基本达到最大百分比。DO 的 PB1 排出时间大约在培养后 10~16 h。DO 的 PB1 排出率显著低于 CEO(24 h,分别为 71.7% 和 86.6%; $P < 0.05$ ),而 NO 培养 24 h 内很少有第一极体排出(24 h,PB1% 为 17.4%)。

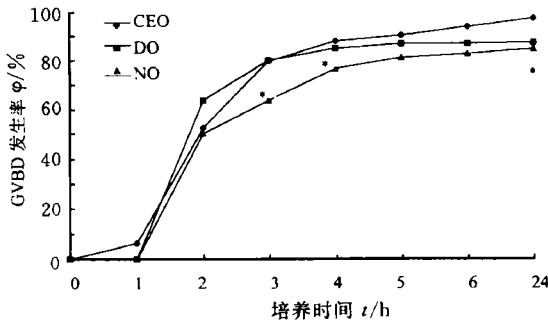


图 1 CEO,NO 及 DO 在 M199 培养液中 GVBD 发生率

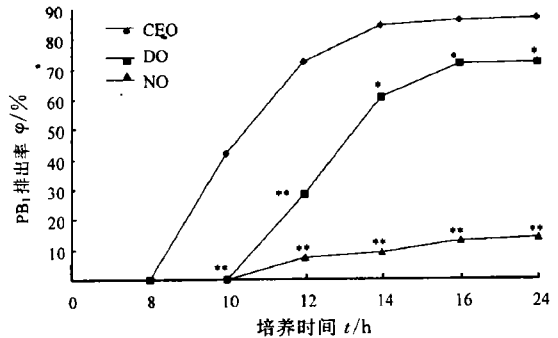


图 2 CEO,NO 及 DO 在 M199 培养液中 PB1 发生率

### 2.2 次黄嘌呤(HX)对卵母细胞成熟的抑制作用

CEO,NO 及 DO 分别培养在  $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  HX 培养液中,24 h 后统计 GVBD 及 PB1 百分率。

从表 1 及图 1,2 可以看出: $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  HX 显著抑制体外培养的 CEO,NO 和 DO 的 GVBD 发生及 PB1 的排出。培养至 24 h,CEO 在 M199 和  $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  HX 培养液中 GVBD 发生率分别为 97.3% 和 17.47%,PB1 百分率分别为 86.6% 和 10.37%,差异极显著( $P < 0.005$ );NO 在 M199 和  $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  HX 培养液中 GVBD 百分率分别为 81.2% 和 10.66% (差异极显著, $P < 0.005$ ),PB1 百分率为 17.4% 和 5.88% (差异显著, $P < 0.05$ );DO 在 2 种培养液中的 GVBD 百分率分别为 87.32% 和 29.99% (差异极显著, $P < 0.005$ ),PB1 百分率为 71.75% 和 7.90% (差异极显著, $P < 0.005$ )。

### 2.3 不含 HX 的环境对卵母细胞减数分裂的启动作用

NO 和 CEO 分别在不含 HX 的培养液中预培养一定时间(10,30,60 min)后转入 HX 培养液中继续培养至 24 h,观察统计 GVBD 和 PB1 百分率(图 3)。

表 1 4 mmol·L<sup>-1</sup> HX 培养液中卵母细胞 GVBD 及 PB1 发生率(24 h)

φ%

细胞模型	细胞数量	GVBD	PB1
CEO	120	17.47±6.49	10.37±5.41
NO	140	10.66±1.56	5.88±3.20
DO	139	29.99±10.11	7.90±3.55

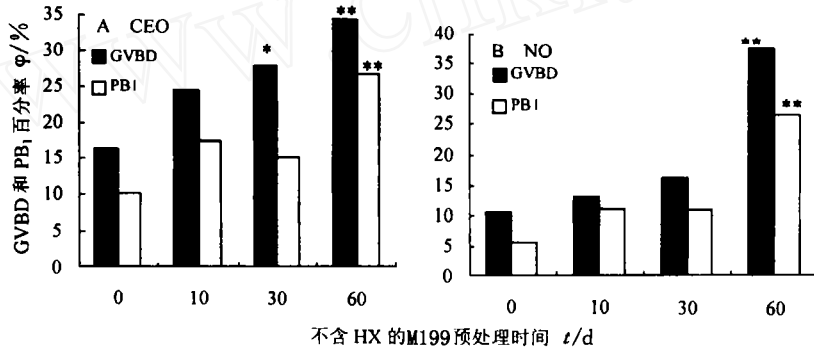


图 3 不含 HX 的 M199 培养液对 CEO 和 NO 的预处理

由图 3 可知：与细胞直接培养在 HX 培养液中相比，M199(不含 HX)预处理细胞 60 min，CEO 和 NO 的 GVBD 和 PB1 发生率明显提高。CEO 的 GVBD%和 PB1%分别为(34.53±6.34)%和(26.87±6.66)%，对照组为(16.43±5.48)%和(10.21±5.32)%，差异极显著( $P < 0.01$ )。60 min 预处理组 NO 的 GVBD%和 PB1%分别为(37.80±0.42)%和(26.8±2.54)%，而对照组为(10.66±1.56)%和(5.88±3.20)%，差异极显著( $P < 0.01$ )。M199 预处理细胞 10 min, 30 min, 均对 GVBD 和 PB1 百分率有一定的提高。以上结果表明，当卵母细胞从卵泡中释放入没有抑制因素的环境时，不可逆地启动了部分卵母细胞减数分裂的恢复。

### 3 讨论

本实验结果表明，昆明白小鼠 CEO 在 M199 培养液中自发成熟时，GVBD 主要发生在 1~5 h，其百分率为 97.8%，PB1 集中在 8~14 h 排出，排出率为 86.6%。据报道，小鼠 GVBD 一般发生在从有腔卵泡中释放后 2~4 h<sup>[6]</sup>，PB1 排出约在培养后 12 h<sup>[7]</sup>。本结果与文献报道基本一致。在实验中，24 h 时 DO 的 GVBD 发生率(81.2%)明显低于 CEO(97.8%)，PB1 百分率也较低(71.7%)。而 Eppig 等<sup>[4]</sup>报道，DO 的 GVBD 和 PB1 百分率分别高于或等于 CEO 的 GVBD 和 PB1 百分率。结果差异的原因可能在二个方面：①所用的实验小鼠品种不同，可能造成其卵母细胞的生物学性质不完全一致。②获得 DO 的方式不同：本实验是采用机械法去除卵丘细胞获得 DO，而 Eppig 的实验却是采用酶消化法获得 DO。不同的处理方式是否会影响卵母细胞的成熟这一问题值得进一步探讨。

夏国良的研究表明 FSH 和 Forskolin 对卵母细胞成熟的刺激作用可能是通过刺激卵丘细

胞分泌一种促卵母细胞成熟因子而实现的<sup>[8]</sup>。本实验中 NO 在 M199 培养液中 24 h 时 PB1 排出率很低(仅为 17.4%),同时 CEO 的 GVBD%明显高于 DO,说明卵丘细胞在卵母细胞成熟过程中起着重要作用,可能是卵丘细胞分泌某种(些)物质而促进卵母细胞成熟。

许多研究表明,HX 存在于几种动物卵泡液并能抑制 CEO 减数分裂的恢复<sup>[9~11]</sup>。HX 的抑制作用可能是通过抑制分解 cAMP 的磷酸二酯酶的活性来实现的<sup>[10]</sup>。本实验也证明了 4 mmol·L<sup>-1</sup>次黄嘌呤在体外明显抑制昆明白小鼠 CEO,NO 和 DO 的 GVBD 发生。

Schultz 等报道,如果卵母细胞先在不含 IBMX 的培养液中预培养 30~40 min(仍处于 GV 期)后转移到含有 IBMX 的培养液中,IBMX 不能抑制 GVBD 的发生<sup>[11]</sup>。即卵母细胞从卵泡中释放入没有抑制因素的环境时,不可逆地启动了一部分卵母细胞减数分裂的恢复。我们的研究证实了这种看法,CEO 在不含 HX 的 M199 培养液中培养 60 min 后在 HX 培养液中继续培养,可以明显降低 HX 对 GVBD 的抑制作用。不可逆地启动卵母细胞减数分裂恢复的因素可能是卵母细胞内 cAMP 水平的变化<sup>[12]</sup>。

### 参 考 文 献

- 1 Vanderhyden B C, Armstrong D T. Role of cumulus cells and serum on the *in vitro* maturation, fertilization and subsequent development of rat oocytes. *Biol Reprod*, 1989, 40: 720~728
- 2 Schroeder A C, Eppig J J. The developmental capacity of mouse oocytes that matured spontaneously *in vitro* is normal. *Dev Biol*, 1984, 102: 493~497
- 3 Eppig J J, O'Brien M J. Development *in vitro* of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol Reprod*, 1996, 54: 197~207
- 4 Eppig J J, Downs S M. Chemical signals that regulate mammalian oocyte maturation. *Biol Reprod*, 1984, 30: 1~11
- 5 Vanderhyden B C, Caron P J, Buccione R. Developmental pattern of the secretion of cumulus-expansion enabling factor by the mouse oocytes and the role of oocytes in promoting granulosa cell differentiation. *Dev Biol*, 1990, 140: 307~317
- 6 Singh B, Barbe G J, Armstrong D T. Factors influencing resumption of meiotic maturation and cumulus expansion of porcine oocyte-cumulus cell complexes *in vitro*. *Mol Reprod Dev*, 1993, 36: 113~119
- 7 Homa S T. Calcium and Meiotic maturation of the mammalian oocyte. *Mol Reprod Dev*, 1995, 40: 122~134
- 8 夏国良. Forskolin 和 FSH 诱导猪卵母细胞克服次黄嘌呤的抑制而成熟的研究. 见: 全国动物生理生化四次学术会议论文摘要汇编, 1995, 45
- 9 Tornell J, Brannstrom M, Magnusson C. Effect of follicle-stimulating hormone and purines on rat oocyte maturation. *Mol Reprod Dev*, 1990, 27: 254~260
- 10 Downs S M. Purine control of mouse oocyte maturation: evidence that nonmetabolized hypoxanthine maintains meiotic arrest. *Mol Reprod Dev*, 1993, 35: 82~94
- 11 Xia G L, Byskov A G, Andersen C Y. Cumulus cells secrete a meiosis-inducing substance by stimulation with forskolin and dibutyric cyclic adenosine monophosphate. *Mol Reprod Dev*, 1994, 39: 17~24
- 12 Schultz R M, Montgomery R, Belanoff J. Regulation of mouse oocyte meiotic maturation: implication of a decrease in oocyte cAMP and protein dephosphorylation in commitment to resume meiosis. *Dev Biol*, 1983, 97: 264~273