

3种磷酸二酯酶对小鼠卵母细胞自发成熟的影响

卜淑敏^{1,2} 周波¹ 夏国良¹

(1. 中国农业大学 生物学院, 北京 100094; 2. 首都体育学院, 北京 100088)

摘要 为探讨和比较磷酸二酯酶(PDE)3、4和5对小鼠卵母细胞体外自发成熟的影响,将小鼠卵丘卵母细胞复合体(COCs)和裸卵(DOs)分别培养在含有或不含有PDE3、4和5特异性抑制剂的M-199培养液中。结果表明:PDE3的特异性抑制剂cilostamide和PDE5的特异性抑制剂zaprinast均能显著抑制小鼠COCs和DOs的自发成熟,且其抑制效应不随培养时间的延长而减弱,但却是可逆的;而PDE4的特异性抑制剂rolipram对小鼠COCs和DOs没有影响。上述结果提示,不同亚型的PDE在小鼠卵母细胞减数分裂过程中具有不同的调节作用。

关键词 磷酸二酯酶; 抑制剂; 卵母细胞成熟; 小鼠; 减数分裂

中图分类号 R-332

文章编号 1007-4333(2007)05-0001-04

文献标识码 A

Effects of the specific inhibitors of phosphodiesterase on oocyte spontaneous meiotic maturation of mouse in vitro

Bu Shumin^{1,2}, Zhou Bo¹, Xia Guoliang¹

(1. College of Biological Science, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. Capital Institute of Physical Education, Beijing 100088, China)

Abstract The objective was to study the effects of the specific inhibitors of PDEs on oocyte spontaneous meiotic maturation of mouse in vitro. Mouse cumulus-oocyte complexes (COCs) and denuded oocytes (DOs) were collected and cultured in a medium supplemented with specific inhibitors of PDEs and the rates of GVBD and PB1 extrusion were observed at different culture periods. The results indicated that both PDE3 inhibitor, cilostamide and PDE5 inhibitor, zaprinast, prevented oocyte spontaneous meiotic maturation. However, the PDE4 inhibitor, rolipram had no effect. The inhibitory effects of both cilostamide and zaprinast did not abate with increasing culture time but was reversed. Collectively, these results suggest that different PDEs have different roles in meiotic maturation of mouse oocytes.

Key words PDE; inhibitors; oocyte maturation; meiotic; mouse

动物克隆和转基因动物的制备都需进行卵母细胞的体外培养,从卵泡中释放的卵丘卵母细胞复合体(cumulus-oocyte complexes, COCs)和裸卵母细胞(denuded oocytes, DOs)在体外培养时都可以自发成熟^[1]。为此,能阻滞卵母细胞体外自发成熟的药物备受生殖生物学家关注,目前国内外普遍采用的药物是磷酸二酯酶(PDE)抑制剂^[2]。

PDEs是一类唯一能水解细胞内环核苷酸第二信使的同工酶,在哺乳动物中,根据PDE动力学、底物特异性、组织细胞中的分布、抑制剂和激动剂以及

氨基酸序列而将其分为11类,如PDE5是其中一类^[3]。研究表明,PDE5能通过降解平滑肌细胞中的环鸟嘌呤核苷(cGMP)而维持可收缩器官(如阴茎、血管、子宫、小肠等)的收缩状态,此外,还调节其他生理过程,如神经元的发生和凋亡等^[3]。笔者以往的研究工作表明,cGMP的动态变化在小鼠卵母细胞成熟过程中非常重要^[4]。由于PDE5能降解细胞中的cGMP^[6],推测其可能在小鼠卵母细胞成熟中起一定作用。为此,本研究观察和比较了PDE3、4和5的特异性抑制剂Cilostamide、Rolipram和Za-

收稿日期: 2007-03-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21021487)

作者简介: 卜淑敏, 博士, 副教授, 主要从事生殖生物学研究, E-mail: boshumin@163.com; 夏国良, 教授, 博士生导师, 通讯作者, 主要从事动物生殖生物学研究, E-mail: glxia@mail.cau.edu.cn

prinast 对小鼠卵母细胞自发成熟的影响^[6],旨在了解3种PDEs在哺乳动物卵母细胞成熟中的作用,为今后进一步探讨卵母细胞成熟的调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和配制

M-199 培养基和丙酮酸钠为 GIBCO 公司产品;孕马血清促性腺激素(PMSG)购自天津实验动物中心;谷氨酰胺(Gln)、次黄嘌呤(HX)、牛血清白蛋白片段(BSA)及PDE3的特异性抑制剂Cilostamide、PDE4的特异性抑制剂Rolipram和PDE5的特异性抑制剂Zaprinast等主要试剂为Sigma公司产品。将3种抑制剂分别溶解在二甲亚砜(DMSO)中,浓度均为10 mmol/L左右,配好后-20℃保存,临用前根据需要将其稀释。DMSO在培养基中的终体积分数不能超过0.1%。

1.2 卵母细胞的采集和培养

24~26 d的性未成熟昆明小鼠,体重14~16 g,购自维通利华实验动物有限公司。自由采食与饮水,室温饲养2~3 d后,每只腹腔注射10 IU PMSG。

注射PMSG 46 h后,颈椎脱臼法处死小鼠,剖开腹腔取出卵巢,放于含有4 mmol/L HX的M-199培养液中,其中含有0.3%(质量分数)BSA,2 mmol/L Gln,0.23 mmol/L 丙酮酸钠,10⁵ IU/L青、链霉素,在体视显微镜下,用灭菌5号半注射针头穿刺大的有腔卵泡,释放COCs。选择包裹3~5层卵丘细

胞的COCs,在37℃含HX的培养液中洗3次。DOs用口径略大于卵母细胞直径的捡卵管轻轻吹打COCs获得。COCs和DOs分别以40~50枚/孔的密度接种于含有不同抑制剂的四孔培养板(美国Nunc公司)内,每孔含1.0 mL成熟培养液,在37℃、5%(体积分数)CO₂、饱和湿度的CO₂培养箱内培养。用体视倒置显微镜观察卵母细胞减数分裂受抑制的情况。

1.3 数据处理

实验重复3次,结果以均值±标准差($\bar{X} \pm s$)表示,t检验,P<0.05为有显著性差异,P<0.01为有极显著性差异。

2 结果

2.1 磷酸二酯酶抑制剂对卵母细胞自发成熟的影响

COCs或DOs在分别含有Cilostamide、Rolipram和Zaprinast 3种PDE抑制剂的成熟培养液中分别培养24 h,结果表明,除Rolipram外,Cilostamide和Zaprinast抑制剂均能显著抑制COCs和DOs的自发成熟,其中Cilostamide的抑制作用最强(表1)。

2.2 磷酸二酯酶抑制剂对小鼠卵母细胞自发成熟影响的时效性

COCs或DOs在含有Cilostamide和Zaprinast 2种PDE抑制剂的成熟培养液中分别培养24、48和72 h,结果表明:Cilostamide对COCs和DOs减数分裂自发恢复的抑制效应不随培养时间延长而显著减弱;HX对COCs自发成熟的抑制效应随培养时间延

表1 磷酸二酯酶抑制剂对小鼠卵母细胞自发成熟的影响

Table 1 Effect of PDE inhibitors on oocyte spontaneous meiotic maturation of mouse %

M-199 + 抑制剂/ (μmol/L)	卵丘卵母细胞复合体 (COCs)		裸卵母细胞 (DOs)	
	GVBD	PB1	GVBD	PB1
M-199 + (0)	100 ±0.00	76.24 ±2.82	97.44 ±2.85	75.60 ±3.81
M-199 + HX(4 000)	21.17 ±1.50**	18.11 ±2.24**	21.66 ±2.28**	17.04 ±1.22**
M-199 + Cilostamide(1)	3.12 ±0.73***	0.00 ±0.00	8.14 ±0.27***	0.00 ±0.00
M-199 + Rolipram(1)	98.34 ±0.51	69.57 ±2.65	—	—
M-199 + Rolipram(10)	98.94 ±1.06	75.03 ±3.28	98.49 ±1.51	69.53 ±5.24
M-199 + Rolipram(100)	95.65 ±2.25	73.56 ±3.46	—	—
M-199 + Zaprinast(10)	47.87 ±6.47**	20.38 ±1.10**	18.22 ±3.5**	11.29 ±1.15**

注: *, **, ***分别表示 $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$ (与对照相比)。%, 为GVBD和PB1与COCs或DOs的数量百分比;GVBD为生发泡裂;PB1为第一极体排出;—,表示未做;下同。

长而显著减弱;延长 Zaprinast 的处理时间时,COCs 和 DOs 的死亡率都显著增加(表 2)。

表 2 磷酸二酯酶抑制剂作用不同时间对小鼠卵母细胞自发成熟的影响

Table 2 Effect of PDE inhibitors on the spontaneous maturation of mouse COCs incubated at different times %

M-199 + 抑制剂/ ($\mu\text{mol/L}$)	培养 24 h			培养 48 h			培养 72 h		
	卵丘卵母细胞复合体		裸卵	卵丘卵母细胞复合体		裸卵	卵丘卵母细胞复合体		裸卵
	GVBD	PB1	GVBD	GVBD	PB1	GVBD	GVBD	PB1	GVBD
M-199 + (0)	100 \pm 0.00	76.24 \pm 2.82	96.32 \pm 1.34	100 \pm 0.00	76.24 \pm 2.82	96.32 \pm 1.34	100 \pm 0.00	76.24 \pm 2.82	96.32 \pm 1.34
M-199 + HX(4 000)	19.01 \pm 2.13	15.60 \pm 1.31	14.35 \pm 2.13	34.89 \pm 4.50 *	20.78 \pm 3.46	26.67 \pm 4.50	43.42 \pm 3.03 *	32.24 \pm 3.24 *	32.58 \pm 3.03 *
M-199 + Cilasimade (1)	3.12 \pm 0.73	0.00 \pm 0.00	3.57 \pm 1.06	3.12 \pm 0.73	0.00 \pm 0.00	5.24 \pm 1.36	3.63 \pm 0.10	0.00 \pm 0.00	8.14 \pm 2.07
M-199 + Zaprinast (10)	45.37 \pm 5.38	18.35 \pm 2.09	15.35 \pm 2.90						

注: * $P < 0.05$ (与培养 24 h 组相比)。空白表示 48 h 后因卵母细胞死亡率显著增加而不再统计。

2.3 磷酸二酯酶抑制剂对小鼠卵母细胞自发成熟抑制作用的可逆性

COCs 或 DOs 在含 Cilasimade、Zaprinast 或 HX 3 种 PDE 抑制剂的成熟培养液中培养 24 h 后,转移到不含上述抑制剂的成熟培养液中继续培养 24 h,

结果表明,Cilasimade、Zaprinast 或 HX 对 COCs 和 DOs GVBD 的抑制作用都是可逆的(表 3)。此外,Cilasimade 对 COCs 和 DOs PB1 排出的抑制效应也是可逆的。

表 3 磷酸二酯酶抑制剂对小鼠卵丘卵母细胞复合体自发成熟抑制作用的可逆性

Table 3 Reversal effects of PDE inhibitors on the spontaneous maturation of mouse oocytes %

M-199 + 抑制剂/ ($\mu\text{mol/L}$)	培养 24 h			后转移到不含药物的培养基中继续培养 24 h		
	卵丘卵母细胞复合体		裸卵	卵丘卵母细胞复合体		裸卵
	GVBD	PB1	GVBD	GVBD	PB1	GVBD
M-199 + HX(4 000)	19.01 \pm 2.13	15.60 \pm 1.31	17.26 \pm 1.55	98.53 \pm 1.47**	22.58 \pm 3.03	75.99 \pm 3.73**
M-199 + Cilasimade(1)	9.32 \pm 2.60	2.48 \pm 2.00	9.77 \pm 1.71	97.23 \pm 1.47**	23.05 \pm 3.77**	66.53 \pm 5.24**
M-199 + Zaprinast (10)	40.12 \pm 2.36	20.90 \pm 1.39	14.12 \pm 2.36	95.46 \pm 2.98**	26.87 \pm 7.52	85.46 \pm 2.98**

注: ** $P < 0.01$ (与培养 24 h 组相比)。

3 讨论

1) 环核苷酸第二信使 cAMP 和 cGMP 在哺乳动物卵母细胞成熟中发挥关键性的调节作用。研究表明,卵丘细胞中高水平的 cAMP 诱导卵母细胞减数分裂恢复,而卵母细胞内高水平的 cAMP 则阻滞卵母细胞减数分裂的恢复^[2]。本研究观察到,PDE3 的选择性抑制剂 Cilostamide 能显著抑制小鼠卵母细胞的自发成熟,而在同样的实验条件下,PDE4 选择性抑制剂 Rolipram 却没有影响。此结果与其他学者对小鼠^[7]、猪^[8-9]、牛^[10]以及恒河猴^[11]相关研究报道结果都相似。进一步观察 PDE5 的选择性抑制剂 Zaprinast 对小鼠卵母细胞自发成熟的影响,结果表明,Zaprinast 能显著抑制小鼠卵母细胞的自发

成熟,其抑制效应比 Cilostamide 弱,类似于 PDE 非选择性抑制剂 HX。PDE5 有可能既在小鼠卵母细胞上表达,又在颗粒细胞上表达,这还有待进一步证实。

2) 本实验中,Cilostamide 对卵母细胞成熟的抑制效应不随体外培养时间的延长而显著减弱,表明它能长久性地阻滞卵母细胞减数分裂的恢复;而 HX 的抑制效应则随培养时间的延长而显著减弱。PDE4 为 cAMP 特异性 PDE,与 cAMP 有很高的亲和力;然而 PDE4 不像 PDE3,并不受 cGMP 抑制。免疫组化证明,PDE 在小鼠卵泡中的表达具有分室化现象,即 PDE3 只在卵母细胞上表达,而 PDE4 只在颗粒细胞上表达^[12]。HX 既是 PDE 的非选择性抑制剂,也是存在于小鼠卵泡液中阻滞卵母细胞减

数分裂恢复的生理性抑制剂^[1]。既然 PDE4 特异性抑制剂对卵母细胞自发成熟没有影响,则可认为 HX 对卵母细胞成熟的阻滞作用是因其对 PDE3 的抑制;但由于它在抑制 PDE3 的同时还能抑制 PDE4,故其对减数分裂的影响既不同于 PDE3 抑制剂又不同于 PDE4 抑制剂,其抑制作用随着体外培养时间的延长而有一定的减弱,而 Cilostamide 的抑制作用却不随培养时间的延长而减弱。卵母细胞中持续存在的高浓度 cAMP 能长时间抑制卵母细胞减数分裂恢复,而卵丘细胞和卵母细胞中同时持续存在高浓度 cAMP 时,则对卵母细胞减数分裂恢复的抑制作用会随着时间的延长而减弱。

3)在本实验中,Zaprinast 虽能抑制卵母细胞的自发成熟,但随着其作用时间的延长,卵母细胞的死亡率显著增加。已知 PDE3 与 cAMP 有高的亲和力,它以 cAMP 为底物但被 cGMP 抑制。cGMP 可以紧密地结合在 PDE3 上而使 cAMP 不被水解^[5]。由此,cGMP 依赖型的 PDE5 抑制剂,虽然它主要能升高卵母细胞中的 cGMP,但同时也能升高 cAMP。PDE5 抑制剂的这种双重性能解释为什么它在卵母细胞培养中的毒性要大于 PDE3 抑制剂 Cilostamide 和 HX。此外,如果将 Cilostamide 和 Zaprinast 处理 24 h 的卵母细胞,转移到不含有抑制剂的新鲜培养基中,95% 以上的卵母细胞仍能够发生 GVBD,表明 Cilostamide 和 Zaprinast 对卵母细胞减数分裂恢复的抑制效应是可逆的。以上结果表明,体外进行卵母细胞操作时,可以考虑用 Cilostamide 来模拟体内阻滞物对卵母细胞成熟的抑制效应,但不能用 Zaprinast。

综上所述,本实验结果首次表明,PDE5 特异性抑制剂 Zaprinast 能显著抑制小鼠卵母细胞的自发成熟,且其抑制效应是可逆的。

参 考 文 献

- [1] Downs S M, Daniel S A, Bornslaeger E A, et al. Maintenance of meiotic arrest in mouse oocytes by purine: modulation of cAMP levels and cAMP phosphodiesterase activity [J]. *Gamet Res*, 1989, 23: 323-334
- [2] Marco C, Carsten B A, Francois R, et al. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2002, 187: 153-159
- [3] Lin Chingshwun, Lin Guiting, Xin Zhongcheng, et al. Expression, distribution and regulation of phosphodiesterase 5 [J]. *Curr Pharm Res*, 2006, 12:3439-3457
- [4] Bu Shumin, Xie Huirong, Tao Yong, et al. Nitric oxide influences the maturation of cumulus cell-enclosed mouse oocytes cultured in spontaneous maturation medium and hypoxanthine-supplemented medium through different signaling pathways [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2004, 223: 85-93
- [5] Klein T, Eltze M, Grebe T, et al. Celecoxib dilates guineapig coronaries and rat aortic rings and amplifies NO/cGMP signaling by PDE5 inhibition [J]. *Cardiovas Res*, 2007, 75: 390-397
- [6] Taniguchi Y, Tonai-Kachi H, Shinjo K. Zaprinast, a well-known cyclic guanosine monophosphate-specific phosphodiesterase inhibitor, is an agonist for GPR35 [J]. *FEBS Lett*, 2006, 580: 5003-5008
- [7] Shitsukawa K, Andersen C B, Richard F J, et al. Cloning and characterization of the cyclic guanosine monophosphate-inhibited phosphodiesterase PDE3A expressed in mouse oocyte [J]. *Biol Reprod*, 2001, 65: 188-196
- [8] Sasseville M, Cote N, Guillemette C, et al. New insight into the role of phosphodiesterase 3A in porcine oocyte maturation [J]. *Dev Biol*, 2006(6): 47-57
- [9] Liang Chenguang, Huo Lijun, Zhong Zhishen, et al. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent activation of mitogen-activated protein kinase in cumulus cells is essential for germinal vesicle breakdown of porcine cumulus-enclosed oocytes [J]. *Endocrinology*, 2005, 146: 4437-44
- [10] Thomas R E, Thompson J G, Armstrong D T, et al. Effect of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors during in vitro maturation of bovine oocytes on meiotic and developmental capacity [J]. *Biol Reprod*, 2004, 71: 1142-1149
- [11] Jensen J T, Zelinski-Wooten M B, Schwino K M, et al. The phosphodiesterase 3 inhibitor ORG 9935 inhibits oocyte maturation during gonadotropin-stimulated ovarian cycles in rhesus macaques [J]. *Contraception*, 2005, 71: 68-73
- [12] Shitsukawa K, Andersen C B, Richard F J, et al. Cloning and characterization of the cyclic guanosine monophosphate-inhibited phosphodiesterase PDE3A expressed in mouse oocyte [J]. *Biol Reprod*, 2001, 65: 188-196