

丙氨酸对卵母细胞膜电位去极化作用及其影响因素

王 凯 杨殿生 王羽峰 张桂芳

(佳木斯医学院生理教研室 154002)

摘要 本文通过微电极细胞内记录方法对丙氨酸促进卵母细胞成熟,导致卵母细胞膜电位去极化及与时间和剂量依赖关系进行了研究。丙氨酸不能使裸化的卵母细胞膜电位去极化;孕酮、丙氨酸及丙氨酸加孕酮对卵母细胞膜电位影响与对照组相比皆有极显著性差异;孕烯醇酮能使膜电位去极化;丙氨酸能明显加强孕烯醇酮的去极化效应。孕烯醇酮与 1 mmol/L 丙氨酸合用后的膜电位去极化差异有统计学意义;50 μ mol/L 雌二醇对卵母细胞膜电位无明显影响,但能完全阻断 10 μ mol/L 孕酮的去极化作用,也能阻断丙氨酸对膜电位去极化作用。

关键词 卵母细胞 雌二醇 孕烯醇酮 丙氨酸 膜电位

离体蟾蜍卵母细胞在体外可以自发成熟,丙氨酸可以加速这一过程。王羽峰等^[1-2]的实验发现,1 mmol/L 丙氨酸处理蟾蜍卵母细胞 20h 后卵母细胞核崩解,皮质部疏松,卵母细胞表面绒毛与微绒毛结构融合,提示卵母细胞趋于成熟。丙氨酸也能使卵母细胞膜钾通透性降低,膜电位去极化,然而,丙氨酸诱导卵母细胞成熟时机理仍不清。长足卵母细胞成熟后,其电生理学标志即为膜电位去极化。阻断卵母细胞成熟也阻断去极化。1993—1995 年我们对此进行了研究,现将结果报道如下:

1 方 法

1.1 实验动物 雌性中华蟾蜍,体重 65—75g,在 10—12 月动物进入冬眠后,由本校动物室提供,实验前动物先放在水池内避光复苏一周,室温 15—18℃。

1.2 卵母细胞制备 方法见李学斌等的报道^[3],实验前破坏动物脑脊髓,开腹取出一小块卵巢组织,用 OR-2 培养液^[4]漂洗 3 次,在室温下(17±1℃)恢复 1—2h,然后开始预培养。测定前,用修表镊子将卵母细胞分离出来,摘除附着在其表面的各种组织。然后移入透明槽内

进行表面培灌,灌流速度为 2ml/min。

1.3 膜电位测定 卵母细胞的膜电位是用普通玻璃微电极测量。微电极尖端直径 $\leq 1\mu$ m,内充 1 mmol/L 的 KCl 溶液,电极电阻为 50 兆欧左右,尖端电位变化小于 3mv,测定时在实体显微镜直视下,通过操纵仪将微电极刺入卵母细胞,经过微电极电信号输入到高阻抗放大器(FD-223 型,USA.)描记于二笔函数记录仪上(永青示波器厂,贵州)。以一根直径为 1mm 的镀氯银丝插入到含有 3mmol/L KCl 的琼脂盐桥里作为参比电极。参比电极一端接培灌液,一端接地。

1.4 结果处理 测定膜电位结果直接用双侧 t 检验进行统计学处理,数据表示为均值(M)±标准误(SE);然后以对照组实测膜电位值为 100%,把实验组值以对照组值的百分数形式表示。测定的卵母细胞数用 n 表示。

2 结 果

2.1 丙氨酸对卵母细胞膜电位的影响 取 1 mmol/L 丙氨酸溶液孵育卵母细胞,观察孵育 16—24h 期间在表面灌流条件下膜电位与对照

组的差异。丙氨酸能引起膜电位去极化。并与对照组有显著差异,对照组膜电位为 $-37.4 \pm 10.3\text{mv}$ (17);丙氨酸组膜电位为 $-28.5 \pm 5.5\text{mv}$ (17), $P < 0.05$ 。

2.2 丙氨酸对裸化卵母细胞的作用 采用胶原酶裸化法^[1]观察丙氨酸的作用,并比较了其膜电位与对照组的差异,1mmol/L 丙氨酸处理 16—20h 期间,裸母细胞膜电位为 $-55.1 \pm 13.1\text{mv}$ (8);对照组裸母细胞膜电位为 $-50.0 \pm 12.1\text{mv}$ (8),两者无统计学差异。

2.3 丙氨酸作用的量效关系 卵母细胞在接受 0.01; 0.1; 1 和 10mmol/L 丙氨酸处理后 16—24h 期间测定膜电位变化(见表 1)。

由表 1 可见随着丙氨酸浓度增加,卵母细胞膜电位去极化程度绝对值逐渐减小。

表 1 丙氨酸作用的量效关系(M±SE)

浓度 (mmol/L)	例数	膜电位 (-mv)
对照	13	30.2 ± 6.2
0.01	13	30.3 ± 6.2
0.1	13	$25.4 \pm 8.8^*$
1	11	$20.3 \pm 6.1^*$

注: * $P < 0.05$

2.4 丙氨酸作用的时效关系 1mmol/L 丙氨酸处理后,卵母细胞膜电位值随培养时间延长而逐渐向去极化方向移动,培养 16—24h; 30—40h 后膜电位即显著性去极化($P < 0.05$)(见表 2)。

表 2 丙氨酸作用的时效关系(M±SE)

时间 (h)	例数	对照组膜电位 (-mv)	丙氨酸组膜电位 (-mv)
2—8	8	34.9 ± 5.7	32.4 ± 4.0
16—24	10	31.5 ± 2.8	$23.3 \pm 7.0^*$
30—40	7	27.1 ± 3.7	$20.4 \pm 4.6^*$
44—48	7	15.6 ± 1.9	17.0 ± 9.0

注: * $P < 0.05$

2.5 丙氨酸对孕酮所致膜去极化作用的影响

用 10 $\mu\text{mol/L}$ 孕酮处理卵母细胞,在 16—24h 内可使膜电位明显去极化。当用 1mmol/L 丙氨酸与孕酮同时处理卵母细胞时,膜电位为 $-17 \pm 2.2\text{mv}$ (n=9),与单用 10 $\mu\text{mol/L}$ 孕酮时膜电位值 $-16.9 \pm 4.1\text{mv}$ (n=15) 相比无统计学

差异(见图 1)。

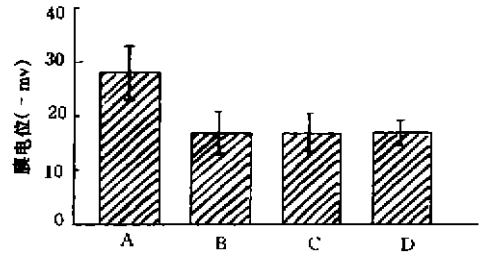


图 1 丙氨酸对孕酮所致膜去极化作用的影响

A: 对照; B: 孕酮; C: 丙氨酸; D: 丙氨酸加孕酮

2.6 丙氨酸对孕烯醇酮所致膜电位去极化作用的影响

用 25 $\mu\text{mol/L}$ 孕酮前体孕烯醇酮,丙氨酸、孕烯醇酮加丙氨酸观察各组膜电位变化,发现孕烯醇酮、丙氨酸及孕烯醇酮加丙氨酸均可致膜电位去极化(见图 2)。

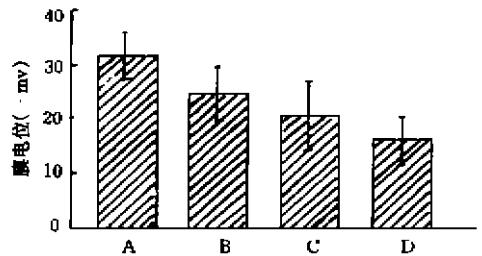


图 2 孕烯醇酮对丙氨酸所致膜去极化作用的影响

A: 对照; B: 孕烯醇酮; C: 丙氨酸; D: 孕烯醇酮加丙氨酸

2.7 雌二醇的作用

有文献报道,雌二醇能拮抗孕酮对卵母细胞的作用^[5],本实验结果也证实了这一点。50 $\mu\text{mol/L}$ 的雌二醇本身对卵母细胞膜电位无显著影响,丙氨酸加雌二醇处理卵母细胞后,膜电位与对照组比无显著变化($P > 0.5$)(见图 3)。

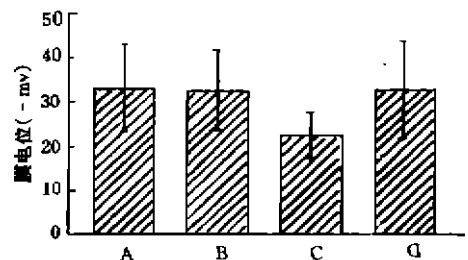


图 3 雌二醇对丙氨酸所致膜电位去极化作用的影响

A: 对照; B: 雌二醇; C: 丙氨酸; D: 丙氨酸加雌二醇

3 讨论

大量的实验证实, 卵母细胞成熟与排卵和卵泡细胞密切相关。一般认为卵母细胞发育过程中, 不断接受卵泡细胞通过缝隙连接输送来的营养物质, 使卵母细胞发育成为长足卵母细胞, 同时通过缝隙连接将 cAMP(环-磷酸腺苷)和次黄嘌呤及 OMI(卵母细胞成熟抑制因子)等物质输入卵母细胞, 由此, 使卵母细胞停止于减数分裂前期。当促卵母细胞成熟因素如 LH 出现时, 卵泡细胞内 cAMP 升高与磷脂酰肌醇动员胞内 $[Ca^{2+}]$ 升高。通过诱导胆固醇 $C_{21,26}$ 侧链裂解酶合成, 加速胆固醇进入线粒体, 并转化为孕烯醇酮。后者在 3β -羟脱氢酶催化下, 自动转化为孕酮, 并抑制芳香化酶活性, 使雌二醇生成减少。雌二醇有抑制孕酮生成的作用, 也能与孕酮竞争孕酮在卵母细胞膜上的结合位点, 由此参与卵母细胞成熟抑制过程。

丙氨酸对卵母细胞的去极化作用具有明显的时间与剂量依赖性。

本实验发现, 丙氨酸虽然可以导致蟾蜍卵母细胞膜电位去极化, 但对裸化的卵母细胞膜电位并无明显影响, 这提示卵泡细胞的存在对丙氨酸的作用是必需的。丙氨酸能加强孕烯醇酮所致的卵母细胞膜电位去极化。据文献报道, 孕烯醇酮只有经过卵泡细胞转化成孕酮才能有效地对卵母细胞发育产生影响, 如果用大

剂量甾酮阻断孕烯醇酮的转化, 则见不到它的生物效应。丙氨酸能加强它对膜电位的影响, 这提示丙氨酸可能促进孕烯醇酮的转化或阻断孕酮的进一步生物转化, 而通过孕酮导致卵母细胞膜电位去极化。本实验结果表明, 丙氨酸加雌二醇处理卵母细胞后, 看不到膜电位去极化反应。这就说明丙氨酸所致膜电位去极化可能完全是通过孕酮实现的。王羽峰等^[1]的实验发现, 1mmol/L 丙氨酸处理蟾蜍卵母细胞 20h 后, 卵母细胞核崩解, 皮质疏松, 卵母细胞表面绒毛与微绒毛结构融合, 提示卵母细胞趋于成熟。这种形态学表现正是孕酮导致膜电学特性变化的基础, 并支持本实验结果。

参 考 文 献

- 1 王羽峰, 成军, 程治平. 氨基酸对蟾蜍卵母细胞膜电位的影响及其作用机制. 生理学报, 1990, 42(6): 515—521.
- 2 王幽兰, 徐国江, 朱先. 蟾蜍卵母细胞成熟过程中卵周膜的变化及其与排卵的关系. 实验生物学报, 1982, 15: 265—283.
- 3 李学斌, 王文辉, 成军等. 胰岛素对蟾蜍卵母细胞膜电位及电解质影响. 动物学报, 1988, 34: 236—242.
- 4 Stinnakre, J. and C. V. Renterghen. Cyclic AMP, Calcium, acetylcholine and the current induced by adenosine in the *xenopus laevis* oocyte. *J. Physiol*, 1986, 374: 551—570.
- 5 王羽峰, 李学斌, 成军等. 亮氨酸对蟾蜍卵母细胞膜电位的影响与孕酮的关系. 佳木斯医学院学报, 1989, 12: 216—217.

《鼠害治理的理论与实践》一书简介

由王祖望和张知彬主编的《鼠害治理的理论与实践》一书, 于 1996 年 8 月由科学出版社正式出版发行。该书是由我国长期从事鼠类生态学与防治方面的十几位著名专家学者及部分青年工作者共同参加编著。全书共分三大部分: 一、鼠害与人类的关系; 二、害鼠的基础生态学; 三、害鼠综合治理。内容涉及鼠类与植物保护, 卫生防疫及生态平衡的关系; 鼠类的行为生态、能量生态、营养生态、繁殖生态、数量调节、天敌捕食作用与寄生作用等。第三部分为我国农田、草原和城乡等主要典型生态区鼠害综合治理的经验和成果, 以及化学灭杀与不育控制的技术与策略。全书共 16 章, 每章均附英文摘要和珍贵的参考文献, 约 56 万字, 定价 39 元。欲购者请寄: 100080 北京市海淀区中关村路 19 号, 中国科学院动物研究所王淑卿收。