

小鼠体外发育成熟卵母细胞的胞浆成熟度评估

彭宇洪^① 庄广伦^{②*} 林健雯^③ 谢守珍^① 程冀平^① 张梦琳^①

(① 广州军区武汉总医院妇产科 武汉 430070; ② 中山大学附属一医院生殖中心 广州 510080;

③ 中山大学附属一医院神经内科 广州 510080)

摘要: 研究通过检测卵母细胞直径、谷胱甘肽含量和皮质颗粒分布来评估其胞浆成熟度。培养小鼠窦前卵泡 13 d 得到 258 个体外发育 M II 期卵母细胞, 控制性超排得到 205 个体内发育的 M II 期卵母细胞。测量卵母细胞直径, 用免疫荧光染色、共聚焦显微镜观察卵母细胞皮质颗粒分布, 化学法测定卵母细胞谷胱甘肽含量。结果发现, 体外发育的卵母细胞直径 $(69.6 \pm 5.7) \mu\text{m}$, 体内发育卵母细胞直径 $(84.2 \pm 3.0) \mu\text{m}$, 两组间存在显著性差异 ($P < 0.01$)。体外发育成熟卵母细胞谷胱甘肽含量 $(4.3 \pm 0.7) \mu\text{mol}$, 体内发育的卵母细胞谷胱甘肽含量 $(6.1 \pm 1.0) \mu\text{mol}$, 两组间存在显著性差异 ($P < 0.05$)。体外发育卵母细胞皮质颗粒环状分布率 36%, 体内发育卵母细胞皮质颗粒环状分布率 90%, 两组间存在显著性差异 ($P < 0.01$)。本实验认为, 体外发育成熟的卵母细胞胞浆成熟度与体内发育成熟的卵母细胞存在差异, 可能是其发育潜能降低的原因之一。体外培养的卵泡内分泌结构改变可能影响卵母细胞胞浆成熟。

关键词: 培养; 卵母细胞; 小鼠; 谷胱甘肽; 皮质颗粒

中图分类号: Q492 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2006)06-36-05

Aberrant Ooplasm Maturation Was Assayed in Mouse Oocytes Cultured *in Vitro*

PENG Yu-Hong^① ZHUANG Guang-Lun^② LIN Jian-Wen^③ XIE Shou-Zhen^①
CHENG Ji-Ping^① ZHANG Meng-Lin^①

(① Department of Obstetrics and Gynecology, Wuhan General Military Hospital, Wuhan 430070;

② Assisted Reproduction Center, the First Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510090;

③ Department of Neurology, the First Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510090, China)

Abstract: Oocytes cultured *in vitro* are not as competent as those growing *in vivo*. In this study, mouse preantral follicles were cultured *in vitro* for 13 days to get M II oocytes. A total of 258 M II oocytes cultured *in vitro* and 205 M II oocytes growing *in vivo* were obtained. The diameter of each oocyte was measured. Cortical granules were immunofluorescently stained, and visualized by confocal microscopy. GSH content in oocyte was quantified by a chemical method. We found that the diameter of *in vitro* cultured oocytes was $69.6 \pm 5.7 \mu\text{m}$, significantly smaller than that of *in vivo* matured oocytes $84.2 \pm 3.0 \mu\text{m}$ ($P < 0.01$). GSH content of *in vitro* cultured oocytes was $4.3 \pm 0.7 \mu\text{mol}$, significantly lower than that of *in vivo* matured oocytes $6.1 \pm 1.0 \mu\text{mol}$ ($P < 0.05$). Cortical granule monolayer ring was observed in 36% of *in vitro* cultured oocytes, but in 90% of *in vivo* matured oocytes ($P < 0.01$). So we conclude that M II oocytes from *in vitro* cultured follicles are not as competent as those from *in vivo* growing follicles, which might be resulted from incomplete ooplasm maturation as indicated by smaller diameter, lower GSH content, and

* 通讯作者, E-mail: pyhlucy@163.com;

第一作者介绍 彭宇洪, 女, 医学博士, 主治医师, 研究方向: 卵泡发育, E-mail: pyhlucy@yahoo.com.cn。

收稿日期 2006-05-20, 修回日期 2006-09-02

abnormal cortical granule distribution.

Key words Culture; Oocyte; Mice; Glutathione; Cortical granule

卵母细胞发育成熟包括核成熟和胞浆成熟两个方面,二者是卵母细胞正常受精、卵裂、发育成正常胚胎的前提条件。卵母细胞核成熟的特征是生发泡破裂、极体排出,其胞浆成熟的表现比较复杂,存在多方面的改变,细胞器重新分布、基因转录和蛋白质合成发生改变等^[1]。目前,囊胚形成率已经被用于评估卵母细胞胞浆成熟度,但是它并不能完全反映卵母细胞的发育潜能^[2],而且也不能评估未进行受精的卵母细胞。目前已经有人用皮质颗粒分布和谷胱甘肽含量评价卵母细胞胞浆成熟度^[3,4]。小鼠GV期卵母细胞的皮质颗粒均匀分布于生殖泡以外的整个胞浆内,成熟卵母细胞的皮质颗粒单层环状分布于细胞膜下,同时染色质和第二次减数分裂纺锤体所在胞浆区域形成无皮质颗粒区(cortical granules free domain, CGFD)^[5,6]。动物实验发现有些卵母细胞核成熟正常但是发育潜能不佳,它们的细胞内皮质颗粒迁移出现障碍,表现为皮质颗粒均匀分布或周边分布比例降低^[7]。老龄小鼠卵母细胞皮质颗粒分布出现局部增多和局部缺失并存,同时细胞内出现大量碎片和局部空泡,这些卵母细胞受精率低^[3]。谷胱甘肽(glutathione, GSH)是哺乳动物细胞内主要的含硫化合物,它主要对抗氧自由基损害。卵母细胞受精后, GSH促进雄原核去浓缩化^[8],并且提高种植前胚胎发育。卵母细胞内GSH含量被认为反映胞浆成熟度^[9]。许多研究表明,体外培养的胚胎中高浓度氧化物是阻断胚胎发育的原因之一^[10]。如果卵母细胞成熟过程中GSH合成量足够抑制氧化物的损害,胚胎就可以顺利发育^[4]。动物实验还发现,老龄小鼠卵母细胞孤雌激活率低于年轻小鼠,其胞浆内GSH水平低于年轻小鼠,可见卵母细胞内GSH是调节卵母细胞受精、激活的重要因素^[11]。因此本研究将卵母细胞内GSH含量和皮质颗粒迁移及分布作为评价卵母细胞胞浆的重要指标。小鼠窦前卵泡经过13 d培养,得到

M II 卵母细胞。我们感兴趣的是这些卵母细胞发育潜能是否正常。本研究对比小鼠体外发育和体内发育成熟卵母细胞GSH含量、皮质颗粒迁移和分布,判断体外发育卵母细胞胞浆成熟度,从而探讨体外培养体系对卵母细胞发育潜能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料来源 出生10 d的昆明小鼠,取出卵巢,分离窦前卵泡,体外培养13 d,得到成熟卵母细胞作为体外发育组;8~12周雌性昆明小鼠,按SPF标准喂养。经控制性促性腺激素刺激后得到成熟卵母细胞作为对照组。

1.2 主要仪器和实验试剂 共聚焦显微镜(Zeiss公司),紫外分光光度计(BIOCHROM公司),体视显微镜(NIKON公司),低温冰箱(SANYO公司),Hoechs 33258(Sigma公司),FITC lectin(Sigma公司), H_3PO_4 , NADPH, 5' 5'-dithio-bis, GSH还原酶, GSH标准品(Sigma公司),孕马血清(宁波激素制品有限公司)。

1.3 样品制备 出生10 d小鼠,机械分离卵泡,选择基底膜完整、形态好的窦前卵泡进行体外培养,每日体视显微镜观察卵泡形态,目镜标尺测量卵泡和卵母细胞的直径;第12 d在培养液中加入hCG 2.5 IU/ml, EGF 5 ng/ml, 14~16 h后收集排出的卵丘细胞卵子复合物。将玻璃吸管拉成直径稍大于卵母细胞的吸管轻轻吹打,去掉卵丘细胞,必要时用0.1%透明质酸酶去掉卵丘细胞,得到卵母细胞;收集卵母细胞,在体视显微镜下测量卵母细胞直径,选择M II 卵母细胞。选择8~12周雌性昆明小鼠,发情后期腹腔注射孕马血清5 IU, 48 h后腹腔注射hCG 5 IU, 14 h后颈椎脱臼处死小鼠。取出子宫输卵管,挑破输卵管膨大部位,得到卵丘细胞卵母细胞复合物(cumulus oocyte complex, COC),用0.1%透明质酸酶消化30 s后PBS洗3次,收集M II 卵母细胞。

1.4 卵母细胞皮质颗粒染色 消化透明带,多聚甲醛固定卵母细胞;0.2% Triton X-100 处理 20 min, PBS + 0.4% BSA 洗 3 次;加入 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 标记 FITC lectin, 染色 30 min; PBS + 0.4% BSA 洗 3 次, 盖片。共聚焦显微镜观察皮质颗粒图像。

1.5 谷胱甘肽测定 156 个体外发育成熟卵母细胞分成 5 组, 每组 30 ~ 40 个卵母细胞; 120 个体内发育成熟卵母细胞分成 4 组, 每组 30 个卵母细胞。每组卵母细胞加入 5 μl 0.2 mol/L NaH_2PO_4 + 5 μl 10 mmol/L Na_4EDTA ; 加入 5 μl 1.25 mol/L H_3PO_4 , -80℃ 保存; 冻融后反复吹打; 依次加入 700 μl 0.33 $\mu\text{g}/\text{ml}$ NADPH, 100 μl 6 mmol/L 5'5'-dithio-bis, 190 μl 蒸馏水, 10 μl 250 IU/ml GSH 还原酶, 反应 15 min; 用紫外分光光度计 412 nm 波长测定吸光度; 标准品 0.02、

0.1、0.2、1 mmol/L GSH 同上法测定吸光度, 制成浓度-吸光度标准曲线; 根据每个样本的吸光度, 在标准曲线得到每组卵母细胞 GSH 浓度; 每个卵母细胞 GSH 含量(pmol) = 浓度(mmol/L) \times 体积(μl)/卵母细胞数目。

2 结 果

2.1 体外与体内发育成熟卵母细胞比较 体外培养得到 258 个 M II 卵母细胞(图 1), 测量其中 52 个卵母细胞直径, 同时测量 45 个体内发育成熟卵母细胞直径。体内成熟卵母细胞大小一致, 细胞浆清亮、均匀, 极体大小一致; 体外成熟卵母细胞细胞浆略暗, 有少量不均匀颗粒, 极体大小不太一致。体外发育成熟卵母细胞直径(69.6 ± 5.7) μm , 体内成熟卵母细胞直径(84.2 ± 3.0) μm , 两组间存在明显差异($P < 0.01$)。

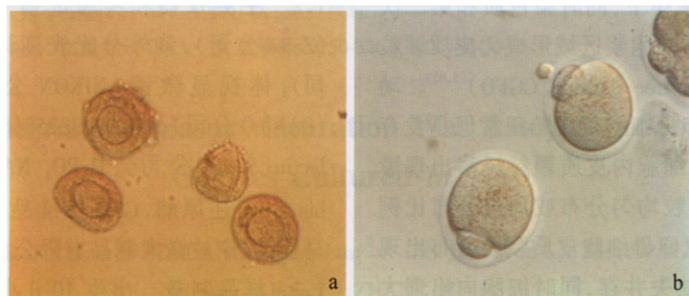


图 1 小鼠窦前卵泡体外培养得到 M II 卵母细胞

Fig.1 *In vitro* culture of mouse preantral follicles

a: 小鼠窦前卵泡 $\times 200$; b: 体外培养 13 d 得到 M II 卵母细胞 $\times 400$ 。

a: Mouse preantral follicles $\times 200$; b: M II oocytes obtained after 13 days of culture $\times 400$.

2.2 体外与体内发育成熟卵母细胞 GSH 含量比较 测定 156 个体外发育和 120 个体内发育成熟卵母细胞。单个体外发育成熟卵母细胞 GSH 含量(4.3 ± 0.7) pmol , 单体内发育成熟卵母细胞 GSH 含量(6.1 ± 1.0) pmol , 体外发育成熟卵母细胞 GSH 含量显著低于体外发育成熟卵母细胞($P < 0.05$)。

2.3 体外与体内发育成熟卵母细胞皮质颗粒分布比较 成熟卵母细胞胞浆内的皮质颗粒向

细胞膜下迁移, 最后在细胞膜下单层环状分布, 同时在染色体分布区域无皮质颗粒; 但是一部分体外发育成熟的卵母细胞皮质颗粒在胞浆内不规则分布(图 2)。

90% 体内发育成熟卵母细胞皮质颗粒周边环状分布, 85% 出现无皮质颗粒区; 体外发育成熟卵母细胞的二者比例分别只有 36% 和 28%, 明显低于体内发育成熟卵母细胞($P < 0.01$) (表 1)。

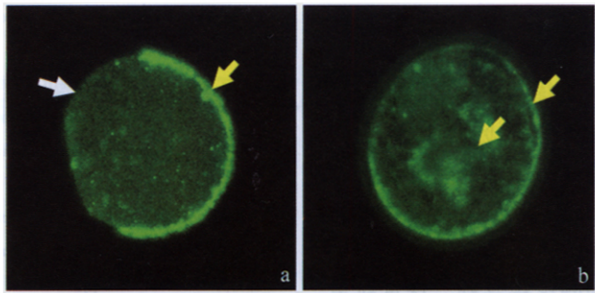


图 2 M II 卵母细胞皮质颗粒分布

Fig.2 Cortical granule distribution in M II oocytes

a:体内发育卵母细胞皮质颗粒分布,黄色箭头指示皮质颗粒呈现绿色荧光环,白色箭头指示无皮质颗粒区 ×400;

b:体外发育卵母细胞皮质颗粒分布,黄色箭头指示皮质颗粒呈现绿色荧光,环状分布和细胞浆内不规则分布同时存在,没有无皮质颗粒区出现 ×400。

a: Cortical granulae distribution in oocytes growing *in vivo*, the yellow arrow directs to green ring of cortical granulae and the white arrow directs to CGFD, ×400; b: Cortical granule distribution in oocytes cultured *in vitro*, the yellow arrow directs to both asymmetrical distribution in ooplasm and ring of cortical granulae without CGFD, ×400.

表 1 体内和体外发育成熟卵母细胞皮质颗粒分布比较
Table 1 Comparison of cortical granule distribution of oocyte growing *in vivo* and *in vitro*

	总数 Total(个)	均匀分布 Humogenous (个)	环状分布 Ring liked (个)	无皮质颗粒区 CGFD (个)
体内 <i>In vivo</i>	40	4	36	34
体外 <i>In vitro</i>	50	32*	18*	14*

* $P < 0.01$

3 讨 论

卵母细胞胞浆成熟度是卵母细胞发育潜能的重要影响因素,本研究通过测定卵母细胞直径、GSH 含量和皮质颗粒迁移及分布来评估卵母细胞胞浆成熟度。结果发现,体外发育成熟卵母细胞的直径比较小,GSH 浓度比较低,皮质颗粒在细胞膜下单层环状周边分布比例低,CGFD 形成率低。体外发育成熟卵母细胞胞浆成熟度低于体内发育的。GSH 是巯基复合物,其合成水平代表卵浆发育水平^[12]。它的作用包括:减少活性氧自由基,保护细胞不受氧化损害;在卵母细胞受精时有助于雄原核的发育,改善种植前胚胎发育^[13]。GSH 含量低的卵母细胞受精率低、囊胚形成率低^[14]。卵母细胞 GSH 含量与卵母细胞直径有关,直径较大的卵母细胞,GSH 含量较高^[15]。本研究显示体外发育成

熟卵母细胞的直径明显小于体内发育的,同时 GSH 含量也明显较低,与以上报道相符。究其原因可能在于小鼠窦前卵泡培养过程中结构改变。卵母细胞生长发育依赖颗粒细胞提供营养物质和分泌因子,卵母细胞本身不能直接利用细胞外 GSH,而是在颗粒细胞帮助下通过卵母细胞内丙氨酸-丝氨酸-半胱氨酸(alanine-serine-cysteine, ASC)转运系统,利用胱氨酸合成 GSH^[16]。窦前卵泡体外培养过程中,颗粒细胞行为模式发生很大变化,从体内球形生长转变为贴壁生长,并超过基底膜向外弥散。颗粒细胞与卵母细胞、颗粒细胞之间的细胞连接可能改变,转运到卵母细胞内胱氨酸减少,可能导致卵母细胞内低水平的 GSH。卵母细胞内低水平的 GSH 可能是卵母细胞发育潜能降低的重要原因之一。另一方面,GSH 也影响颗粒细胞活性和卵丘扩张^[17]。本研究体外成熟过程中,GSH 减少反过来抑制卵丘扩张,可能是卵母细胞成熟率相对低的原因之一。

皮质颗粒迁移是评价哺乳动物卵母细胞胞浆成熟标准。GV 期卵母细胞皮质颗粒平均分布。M I 期颗粒细胞逐渐向细胞皮质区域迁移,表现为皮质分布,M II 期形成细胞膜下单层环状周边分布。体内成熟卵母细胞表现为周边分布^[18]。啮齿类动物卵母细胞临近第一极体

排出的位置出现无皮质颗粒区,覆盖纺锤体和染色体分布区域^[19]。本实验发现体内发育成熟卵母细胞皮质颗粒环状周边分布,伴随无皮质颗粒区出现。但是体外发育成熟卵母细胞皮质颗粒周边分布比例低,而且无皮质颗粒区形成比例低。皮质颗粒分布对于卵母细胞受精非常重要,因为受精过程触发皮质颗粒与细胞膜结合,发生皮质反应,抑制多精受精。体外培养的卵母细胞皮质颗粒分布异常可以预测其受精及其后发育异常。

总之,体外发育成熟卵母细胞直径、GSH 含量和皮质颗粒分布都出现异常,显示其胞浆成熟度存在缺陷。其原因可能在于窦前卵泡体外培养过程中,颗粒细胞生长模式改变,颗粒细胞间和颗粒细胞-卵母细胞细胞连接可能发生改变。优化培养体系改善颗粒细胞功能可能是提高卵母细胞发育潜能的一条途径。

参 考 文 献

- [1] Van Blerkom J. Microtubule mediation of cytoplasmic and nuclear maturation during the early stages of resumed meiosis in cultured mouse oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88** (11): 5 031 ~ 5 035.
- [2] Eppig J J, O'Brien M J. Comparison of preimplantation developmental competence after mouse oocyte growth and development *in vitro* and *in vivo*. *Theriogenology*, 1998, **49** (2): 415 ~ 422.
- [3] Diaz H, Esponda P. Ageing-induced changes in the cortical granules of mouse eggs. *Zygote* 2004, **12** (2): 95 ~ 103.
- [4] Gasparini B, Sayoud H, Neglia G, et al. Glutathione synthesis during *in vitro* maturation of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effects of cysteamine on embryo development. *Theriogenology* 2003, **60** (5): 943 ~ 952.
- [5] Ducibella T, Kurasawa S, Rangarajan S, et al. Precocious loss of cortical granules during mouse oocyte meiotic maturation and correlation with egg-induced modification of the zona pellucida. *Dev Biol*, 1990, **137** (1): 46 ~ 55.
- [6] Ducibella T, Anderson E, Albertini D F, et al. Quantitative studies of changes in cortical granule number and distribution in the mouse oocyte during meiotic maturation. *Dev Biol*, 1988, **130** (1): 184 ~ 197.
- [7] Velilla E, Izquierdo D, Rodriguez-Gonzalez E, et al. Distribution of prepubertal and adult goat oocyte cortical granules during meiotic maturation and fertilization: ultrastructural and cytochemical study. *Mol Reprod Dev* 2004, **68** (4): 507 ~ 514.
- [8] Perreault S D, Barbee R R, Slott V I. Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. *Dev Biol*, 1988, **125** (1): 181 ~ 186.
- [9] Funahashi H, Day B N. Effect of cumulus cells on glutathione content of porcine oocytes during *in vitro* maturation. *J Anim Sci*, 1995, **73** (suppl. 1): 90.
- [10] Takahashi M, Nagai T, Hamano S, et al. Effect of thiol compounds on *in vitro* development and intracellular glutathione content of bovine embryos. *Biol Reprod*, 1993, **49** (2): 228 ~ 232.
- [11] Tarin J J, Gomez-Piquer V, Pertusa J F, et al. Association of female aging with decreased parthenogenetic activation, raised MPF, and MAPKs activities and reduced levels of glutathione S-Transferases activity and thiols in mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 2004, **69** (4): 402 ~ 410.
- [12] Eppig J J. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reprod Fertil Dev*, 1996, **8** (4): 485 ~ 489.
- [13] 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. *Zygote*, 2001, **9** (4): 323 ~ 330.
- [14] Rodriguez-Gonzalez E, Lopez-Bejar M, Mertens M J, et al. Effect on *in vitro* embryo development and intracellular glutathione content of the presence of thiol compounds during maturation of prepubertal goat oocytes. *Mol Reprod Dev*, 2003, **65** (4): 446 ~ 453.
- [15] Liu R H, Li Y H, Jiao L H, et al. Extracellular and intracellular factors affecting nuclear and cytoplasmic maturation of porcine oocytes collected from different sizes of follicles. *Zygote* 2002, **10** (3): 253 ~ 260.
- [16] Matos D G, Fumus C C, Moses D F. Glutathione synthesis during *in vitro* maturation of bovine oocytes: role of cumulus cell. *Biol Reprod*, 1997, **57** (6): 1 420 ~ 1 425.
- [17] Fumus C C, Matos D G, Moses D F. Cumulus expansion during *in vitro* maturation of bovine oocytes: relationship with intracellular glutathione level and its role on subsequent embryo development. *Mol Reprod Dev*, 1998, **51** (1): 76 ~ 83.
- [18] Deng M Q, 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. *Devel Biol* 2003, **257** (1): 166 ~ 176.
- [19] Hoodbhoy T, Talbot P. Characterization, fate, and function of hamster cortical granule components. *Mol Reprod Dev* 2001, **58** (2): 223 ~ 235.