卵丘细胞产生的一氧化氮促进小鼠卵母细胞的成熟

卜淑敏 夏国良* 谢辉蓉 郭 勇

(中国农业大学生物学院, 北京 100094. * 联系人, E-mail: glxia@mail.cau.edu.cn)

摘要 采用体内注射一氧化氮合酶(NOS)抑制剂左旋硝基精氨酸甲基酯(L-NAME)和在体外培养基中分别加入 L-NAME 或次黄嘌呤以抑制卵母细胞自发成熟的 3 种模型, 研究了一氧化氮(NO)供体硝普钠(SNP)对小鼠卵母细胞体内、外成熟的促进作用. 结果表明, 只有腹腔注射 2.5 mg/kg SNP 这一剂量组能显著逆转 10 mg/kg L-NAME 对卵母细胞第一极体(PB_1)释放的抑制作用($P < 0.05$), 而高剂量 SNP (10 mg/kg)使小鼠在注射药物半小时后全部死亡; 10^{-7}, 10^{-6}和10^{-5} mol/L 浓度的 SNP 能显著促进由 4 mmol/L 次黄嘌呤抑制的卵丘卵母细胞复合体(CEO)中卵母细胞的体外成熟, 而 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-8} mol/L SNP 对 CEO 中卵母细胞的体外成熟无影响; 最适浓度的 SNP(10^{-5} 和 10^{-6} mol/L)不影响裸卵(DO)的体外成熟; 10^{-3} mol/L L-NAME 能显著抑制 CEO PB_1 的释放, 但对生发泡破裂(GVBD)无影响, 而 10^{-5} mol/L SNP 能显著逆转其抑制. 结果提示, 卵丘细胞产生的生理剂量的 NO 可以促进体内、外卵母细胞的成熟.

关键词 硝普钠 卵母细胞成熟 第一极体 生发泡破裂 小鼠

近年来, 以动物克隆、转基因动物、生物反应器等技术为内容的胚胎工程技术得到了迅猛的发展, 但这些技术都需要用成熟卵母细胞. 因此, 对高质量成熟卵母细胞的需求量也迅速增加. 由于卵母细胞的发育成熟受卵泡内许多因素的影响, 是一个极其复杂的过程, 而目前对其成熟调节的机制尚不十分清楚, 从而制约了成熟卵母细胞的质量. 因此, 有关卵母细胞发育成熟机理及其调控的研究, 就成为当前生殖生物学研究的一个热点. 一氧化氮(nitric oxide, NO)作为一种新型的细胞间及细胞内信息分子, 广泛参与机体的病理、生理调节过程, 其在卵巢中的作用已引起生殖生物学家的广泛重视[1]. 硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)是常用的 NO 供体之一, 已被许多人用于 NO 的研究, 而有关其对小鼠卵母细胞成熟影响的研究在国内目前尚属空白, 国外只有体外的研究, 未见体内研究的报道[2~6]. 我们的前期工作证明, 给小鼠腹腔注射 hCG 后 2 h 注射一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)抑制剂左旋硝基精氨酸甲基酯(L-NAME)能显著抑制卵母细胞第一极体((PB_1)的释放, 那么 L-NAME 究竟是直接抑制卵母细胞 PB_1 的释放, 还是通过抑制 NOS 表达, 减少 NO 的生成而间接抑制卵母细胞的成熟? 为此, 本研究采用给小鼠腹腔同时注射 L-NAME 和 SNP 后, 取出卵母细胞进行体外观察, 或将卵母细胞取出置于含有不同浓度 SNP 的 L-NAME 或 4 mmol/L 次黄嘌呤的培养液中进行体外培养的方法, 研究了 NO 对小鼠卵母细胞体内、外减数分裂成熟的影响, 为确定 NO 参与卵母细胞成熟提供实验证据, 也为揭开卵母细胞成熟分裂调控机理的奥秘奠定基础.

1 材料和方法

(ⅰ) 试剂. M199 培养基和丙酮酸钠为 GIBCO 公司产品; 孕马血清促性腺激素(PMSG)和人绒毛膜促性腺激素(hCG)购自天津实验动物中心; 硝普纳(SNP)、左旋硝基精氨酸甲基酯(L-NAME)、L-谷氨酰胺(Gln)、次黄嘌呤(HX)、牛血清白蛋白(BSA)V 片段、透明质酸酶以及其他试剂为 Sigma 公司产品.

(ⅱ) 动物. 24 ~ 26 d 的性未成熟昆明白小鼠, 体重 14 ~ 16 g, 购自中国科学院遗传研究所实验动物中心. 自由采食与饮水, 室温饲养 2 ~ 3 d 后, 每只腹腔注射 10 IU PMSG.

(ⅲ) 小鼠体内实验. 注射 PMSG 48 h 后, 每只腹腔注射 5 IU hCG. 随后, 将 70 只小鼠随机分为 7 组. 对照组(10 只)于注射 hCG 后 2 h 注射同等剂量的生理盐水; L-NAME 组(10 只)于注射 hCG 后 2 h 注射 10 mg/kg L-NAME; SNP 组 50 只(平分为 5 组)于注射 hCG 后 2 h 注射 10 mg/kg L-NAME 的同时分别注射 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 和 10.0 mg/kg SNP. 各组小鼠均在注射 hCG 14 ~ 17 h 后, 颈椎脱臼法处死, 剖开腹腔, 取出输卵管, 在体视解剖镜下, 撕开输卵管透明膨大的壶腹部, 将释放出的卵丘-卵母细胞复合体(CEO)移

入含透明质酸酶(0.1%)的 M199 培养液(其中含有 0.3% BSA, 2 mmol/L Gln, 0.23 mmol/L 丙酮酸钠, 1×10^5 IU/L 青、链霉素)中, 在 37℃, 5%的 CO_2 培养箱中培养 15 min, 立即在倒置显微镜下观察并记录各组卵母细胞减数分裂的情况, 以 GVBD 作为卵母细胞核成熟的标志, PB_1 释放作为第 1 次减数分裂完成的标志.

(ⅳ) 小鼠体外卵母细胞的采集和培养. 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 M199 培养液(其中含有 0.3% BSA, 2 mmol/L Gln, 0.23 mmol/L 丙酮酸钠, 1×10^5 IU/L 青、链霉素, 此培养液定名为 HX 培养液)中, 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 CEO. 选择包裹 3~5 层卵丘细胞的 CEO, 在 38.5℃的 HX 培养液中洗 3 次. 裸卵(DO)是用口径略大于卵母细胞直径的捡卵管轻轻吹打 CEO 几次获得. CEO 和 DO 分别以 20~30 枚/孔的密度培养于含有不同药物的 4 孔培养板(Nunc 公司) 内, 每孔含 0.5 mL HX 培养液, 在 37℃, 5% CO_2, 饱和湿度的 CO_2 培养箱内培养 24 h. 培养结束后, 在体视显微镜下观察卵母细胞减数分裂的情况.

(ⅴ) 数据处理. 体外实验重复 4 次, 结果以均值 ± 标准差($X \pm S$)表示, 用 t 检验进行统计分析.

2 结果

2.1 腹腔注射不同剂量 SNP 对小鼠卵母细胞体内成熟的影响

我们早期的工作证明, 腹腔注射 10 mg/kg L-NAME 能显著抑制小鼠卵母细胞 PB_1 的释放($P < 0.05$)[7]. 为此, 我们采用此模型研究了 SNP 能否逆转 L-NAME 的抑制. 由表 1 可见, 对照组, L-NAME 组以及 SNP 4 个剂量组的卵母细胞 GVBD 率均为 100%, 表明 L-NAME 和 SNP 对小鼠体内卵母细胞 GVBD 无影响. L-NAME 组小鼠卵母细胞 PB_1 的排出率明显低于对照组, 二者有显著差异($P < 0.05$); 而 SNP 各组小鼠卵母细胞 PB_1 的排出率与 L-NAME 组相比, 只有 2.5 mg/kg 这一剂量组能显著逆转 L-NAME 对卵母细胞 PB_1 释放的抑制作用($P < 0.05$), 其他各剂量组虽都有一定程度的逆转, 但未见统计学差异. 此外, 我们给 10 只小鼠腹腔注射 10 mg/kg L-NAME 的同时, 注射 10 mg/kg SNP, 结果 10 只小鼠均在注射药物半小时后死亡.

表 1 腹腔注射 SNP 和 L-NAME 对小鼠卵母细胞体内成熟的影响

组别	实验动物数 (CEO 数)	GVBD /%	PB_1 / %	形态不正常率/%
对照	10(180)	100	44.47 ± 0.47	1.66 ± 0.54
L-NAME	10(199)	100	28.60 ± 0.60[a)]	6.65 ± 1.95
SNP-1	10(207)	100	33.95 ± 2.49	5.49 ± 1.26
SNP-2	10(206)	100	35.86 ± 1.52	7.20 ± 2.15
SNP-3	10(218)	100	49.51 ± 0.93[b)]	2.72 ± 0.82
SNP-4	10(200)	100	37.32 ± 1.76	4.39 ± 1.06
SNP-5	注射 SNP 半小时后, 10 只小鼠全部死亡			

a) 与对照组相比, $P < 0.05$; b) 与 L-NAME 组相比, $P < 0.05$

2.2 SNP 对体外次黄嘌呤抑制的小鼠卵母细胞成熟的影响

将小鼠 CEO 分别培养在含有不同浓度 SNP 的 HX 培养液中, 24 h 后, 卵母细胞减数分裂的情况见图 1. 10^{-3}, 10^{-4} 以及 10^{-8} mol/L 的 SNP 对卵母细胞 GVBD 发生率没有影响, 而 10^{-5}, 10^{-6} 和 10^{-7}mol/L 的 SNP 却能显著增加 CEO 中卵母细胞的 GVBD 百分率, 由对照组的(18.44 ± 0.79)%, 分别增加到(57.50 ± 2.50)%, (44.20 ± 1.70)%和(34.84 ± 1.52)%, 其中 10^{-5} mol/LSNP 的促进效应最大($P < 0.05$); 另外, 10^{-5} mol/L($P < 0.01$)和 10^{-6} mol/L($P < 0.05$)两个浓度的 SNP 也能显著促进 CEO 中卵母细胞 PB_1 的释放, 由对照组的(12.70 ± 1.06)%, 分别增加到(45.09 ± 0.40)%和(30.13 ± 2.13)%, 而 SNP 其他浓度组虽都有所促进,

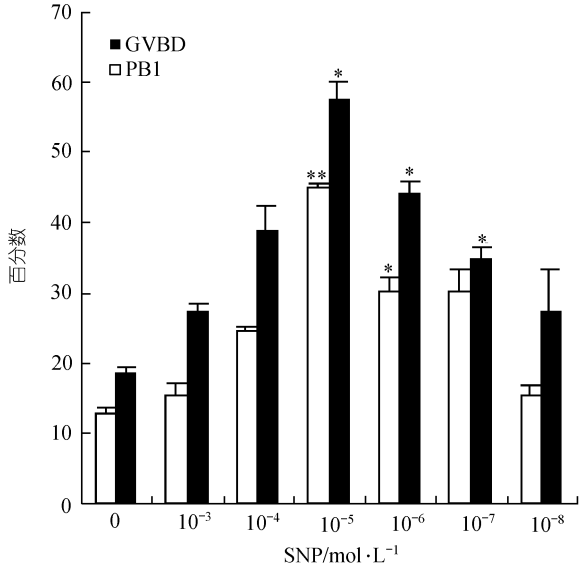


图 1 SNP 对次黄嘌呤抑制的 CEO 体外成熟的影响
图中 0 为对照, 与对照相比, * 示 $P < 0.05$, ** 示 $P < 0.01$

但无统计学差异. 此外, 将去卵丘细胞后的卵母细胞, 即 DO 分别培养在含有 10^{-5} 和 10^{-6} mol/L SNP 两个有效剂量的 HX 培养液中, 发现 SNP 无论是对 DO 的 GVBD 还是对 PB_1 的释放均没有显著影响(图 2).

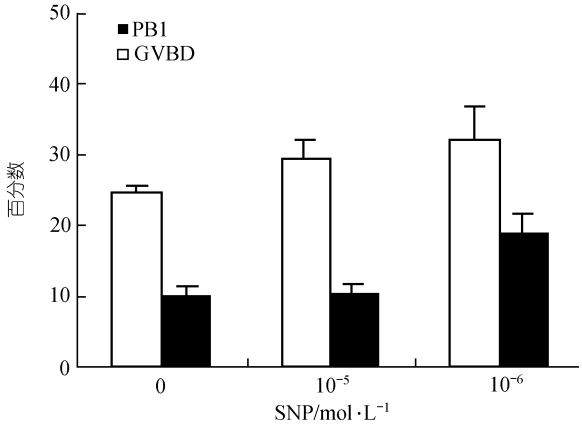


图 2 SNP 对次黄嘌呤抑制的 DO 体外成熟的影响
图中 0 为对照, 与对照相比, $P > 0.05$

2.3 SNP 对 L-NAME 抑制的小鼠卵母细胞体外成熟的影响

将小鼠 CEO 分别培养在成熟培养液(除不含 HX 外, 其他成分同 HX 培养液), 含 L-NAME (10^{-3} mol/L) 以及含 L-NAME(10^{-3} mol/L) + SNP(10^{-5} mol/L)的成熟培养液中, 24 h 后结束培养, 卵母细胞 GVBD 百分率分别为: (96.09 ± 2.48)%, (91.29 ± 3.62)%和(94.12 ± 1.65)%; PB_1 百分率分别为(85.81 ± 1.37)%, (55.44 ± 1.34)%和(86.12 ± 2.00)%(图 3). 由图 3 可见, 10^{-3} mol/L 的 L-NAME 对 CEO 中卵母细胞 GVBD 发生率

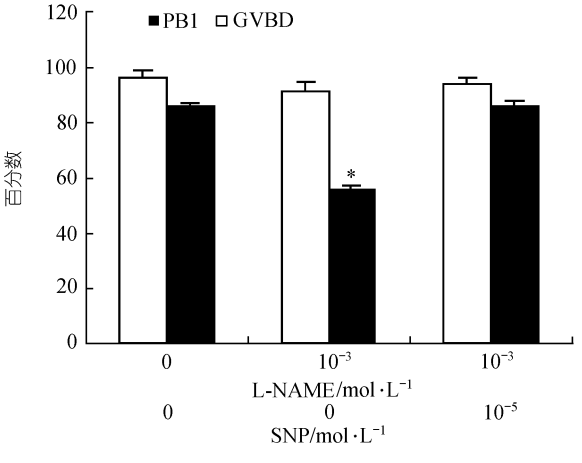


图 3 SNP 对 L-NAME 抑制的 CEO 体外成熟的影响
图中 0 mol/L L-NAME 示对照, 与对照相比, * 示 $P < 0.05$

没有影响, 但能显著抑制 CEO 中卵母细胞 PB_1 的释放($P < 0.05$), L-NAME 对 PB_1 排出的抑制作用可被 10^{-5} mol/L 浓度的 SNP 逆转.

3 讨论

本实验利用体内和体外 3 种模型证明 NO 确实参与了小鼠卵母细胞减数分裂成熟的过程. NOS 抑制剂能够显著抑制卵母细胞的成熟, 这种抑制作用可以被 NO 供体所逆转, NO 供体能够促进 CEO 中卵母细胞的成熟, 但对 DO 的成熟无效, 说明卵丘细胞是产生 NO 的场所之一.

NO 既是一种不稳定的小分子有害气体, 又是一种生物活性物质, 是目前研究较多的体内信息分子. 它在细胞信息传递、细胞防御和细胞损伤中起重要作用. 体内 NO 是由 NOS 催化 L-精氨酸(L-Arg)转变为 L-瓜氨酸时产生的, 其非选择性抑制剂 L-NAME 既能抑制内皮型一氧化氮合酶(eNOS)的活性又能抑制诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的活性, 从而使 NO 的生成减少; 其供体 SNP 能通过一种不涉及 NOS 的机制直接从其分子释放 NO, 从而增加 NO 的生成[4]. 本实验的体内实验证明, 无论是对照组、L-NAME 组还是 SNP 组, 从输卵管壶腹部释放出的卵母细胞全部发生 GVBD, 但与对照组相比, 腹腔注射 10 mg/kg L-NAME 的小鼠, 其 PB_1 的排出被显著抑制($P < 0.05$), 而腹腔注射 10 mg/kg L-NAME 的同时, 注射 2.5 mg/kg SNP 能显著逆转 10 mg/kg L-NAME 对卵母细胞成熟的抑制作用($P < 0.05$); 本实验的体外实验同样证明, 10^{-3} mol/L L-NAME 不影响体外培养的 CEO 中卵母细胞的 GVBD 发生率, 但是能显著抑制 CEO 中卵母细胞 PB_1 的释放, 而 10^{-5} mol/L 的 SNP 则能显著逆转这种抑制作用. 提示体内、外 L-NAME 和 SNP 都是通过改变 NO 的浓度而发挥间接抑制卵母细胞成熟的作用. 此外, 本实验中腹腔注射高剂量 SNP(10 mg/kg)的 10 只小鼠在注射半小时后全部死亡, 提示作为信号物质, NO 的含量应控制在一定的水平, 其浓度一旦超过机体的生理剂量水平就能导致动物死亡.

Sengoku 等人[3]报道, 10^{-3}, 10^{-5} 和 10^{-7} mol/L 的 SNP 都不影响 DO 的体外成熟, 而 10^{-7} mol/L 的 SNP 能显著促进由 300 μmol/L dbcAMP 阻滞的 CEO 的体外成熟; 同样, 10^{-3}, 10^{-5} 和 10^{-7} mol/L 的 L-NAME 也

只能剂量依赖性地抑制 CEO 的体外成熟[3]. 而 NOS 的免疫组化定位证明, 不仅发育成熟的卵母细胞的卵丘细胞表达 eNOS 和 iNOS, 而且卵母细胞本身也表达 eNOS 和 iNOS[8]. 那么, 为什么主要抑制 eNOS 活性的 L-NAME 对 DO 的体外成熟没有影响呢? 由于 dbcAMP 并不是卵泡中抑制卵母细胞成熟的生理性抑制剂, 为此, 我们在一个更宽的浓度范围内, 考察了 SNP 对由卵泡中抑制卵母细胞成熟的生理性抑制剂, 即 4 mmol/L 次黄嘌呤抑制的 CEO 和 DO 的体外成熟的作用[9]. 我们的研究进一步证明, 10^{-3}, 10^{-4} 和 10^{-8} mol/L 的 SNP 对 CEO 的体外成熟没有统计学影响, 而 10^{-5} 和 10^{-6} mol/L 的 SNP 却能显著促进 CEO 的体外成熟, 但不影响 DO 的体外成熟. 提示 SNP 对卵母细胞的成熟有促进作用且是通过卵丘细胞间接发挥的.

有关 NO 对卵母细胞成熟影响的机制目前并不清楚. 但可能与 NO 激活鸟苷酸环化酶, 增加 cGMP 有关[10]. 哺乳动物卵母细胞减数分裂的阻滞和恢复涉及核苷酸的变化, 尤其是 cAMP 的变化, 高浓度 cAMP 维持卵母细胞减数分裂的阻滞, 而 cAMP 下降则促进减数分裂的恢复. cAMP 下降是由于磷酸二酯酶(PDE)被激活引起 cAMP 降解或阻止 cAMP 从颗粒细胞向卵母细胞转运而造成的[9]. 已知鸟苷酸环化酶位于颗粒细胞上[11], 由此推测 NO 能激活位于颗粒细胞上的鸟苷酸环化酶而增加 cGMP, cGMP 则通过激活卵母细胞表面的 cAMP-PDE 而降低卵母细胞内的 cAMP, 从而促进卵母细胞减数分裂的恢复. 由此可见颗粒细胞产生的 NO 可能是调节卵母细胞成熟的重要因子之一, 而且 NO 可能是通过调节卵丘细胞的核苷酸的合成方式来影响卵母细胞成熟的, 这一点有待以后的进一步证实.

目前, 国内外有关 NO 对卵母细胞形态影响的研究, 报道结果不一, Jablonka-Shariff 等人[12]的研究显示, 将 CEO 培养在含有 10^{-3} mol/L 浓度的 L-NAME 培养基中, 形态不正常的卵母细胞显著增加. 而 Sengoku 等人[3]却报道 10^{-3} mol/L 浓度的 L-NAME 并不显著影响卵母细胞的形态. 为此, 我们不仅观察了腹腔注射 L-NAME 的小鼠排出的卵母细胞的形态, 而且观察了培养在含有 L-NAME 培养液中的卵母细胞的形态, 结果表明, 在本实验剂量范围内, L-NAME 对体内、外卵母细胞的形态都没有统计学意义的影响, 但今后应从细胞骨架、卵母细胞受精能力等方面进一步考察 NO 对卵母细胞质量的影响.

致谢 本工作为国家杰出青年基金(批准号: 30025032)和北京市自然科学基金资助项目(批准号: 6992019).

参 考 文 献

1 Dixit V D, Parvizi N. Nitric oxide and the control of reproduction. Animal Reprod Sci, 2001, 65(1-2): 1 ~ 16

2 张璇, 祝诚. 一氧化氮在雌性生殖系统中的作用. 科学通报, 2002, 47(13): 961 ~ 965

3 Sengoku K, Takuma N, Horikawa M, et al. Requirement of nitric oxide for murine oocyte maturation, embryo development and trophoblast outgrowth in vitro. Mol Reprod Dev, 2001, 58: 262 ~ 268

4 Yousif M H, Oriowo M A, Williams K I. Sodium nitroprusside-induced cGMP-independent vasodilator responses in the perfused rabbit ovarian vascular bed. Pharmacol Res, 1998, 38(5): 381 ~ 386

5 Shukovski L, Tsafriri A. The involvement of nitric oxide in the ovulatory process in the rat. Endocrinology, 1994, 135: 2287 ~ 2290

6 Jablonka-Shariff A, Basuray R, Olson L M. Inhibitors of nitric oxide synthase influence oocyte maturation in rats. J Soc Gynecol Investig, 1999, 6: 95 ~ 101

7 张建超, 夏国良, 崔胜, 等. 体内抑制一氧化氮合酶对小鼠卵母细胞成熟和排卵的影响. 中国农业大学学报, 2001, 6(5): 1 ~ 4

8 Zackrisson U, Mikani M, Wallin A, et al. Cell-specific localization of nitric oxide synthase (NOS) in the rat ovary during follicular development, ovulation and luteal formation. Hum Reprod, 1996, 12: 2667 ~ 2673

9 Downs S M, Daniel S A, Bornslaeger E A, et al. Maintenance of meiotic arrest in mouse oocytes by purines: modulation of cAMP levels and cAMP phosphodiesterase activity. Gamete Res, 1989, 23: 323 ~ 334

10 Schmidt H W, Lohmann S M, Walter U. The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. Biochem Biophys Acta, 1993, 1178: 153 ~ 175

11 Dail W G, Sanborn C R, Ratner A. Immunocytochemical localization of cyclic AMP and cyclic GMP in rat ovarian tissue. Biol Reprod, 1980, 22: 281 ~ 288

12 Jablonka-Shariff A, Olson M. Nitric oxide is essential for optimal meiotic maturation of murine cumulus-oocyte complexes *in vitro*. Mol Reprod Dev, 2000, 55: 412 ~ 421

(2002-06-13 收稿, 2002-08-23 收修改稿)