

小鼠体外发育卵母细胞生长分化因子-9基因表达

卵母细胞与卵泡细胞的双向交流对于卵母细胞发育和以后的受精、胚胎发育潜能有重要意义[1], 所以卵母细胞在卵泡生成中所起的作用应得到充分重视。卵母细胞分泌一种或多种因子, 以旁分泌方式调节颗粒细胞的活动和功能, 并参与调节卵泡生长的微环境, 使之有利于卵母细胞成熟[2]。从初级卵泡阶段开始, 卵母细胞分泌生长分化因子9(GDF-9), 这是转移生长因子 β (TGF β)超家族中比较特殊的生长因子。GDF-9在卵泡发育过程中不可或缺, 它可以模拟卵母细胞的某些功能, 维持卵泡的正常形态, 其作用表现在以下几个方面: (1) GDF-9缺乏的雌鼠不孕, 因为卵泡发育停留于3a卵泡阶段, 不再继续生长[3]。GDF-9缺乏的卵泡不能释放一种信号来募集卵泡周围的卵泡膜细胞前体, 也不能有效刺激颗粒细胞增生[4]。(2) GDF-9可以帮助去掉卵母细胞的卵泡保持球形外观并能刺激卵丘扩张[5]。(3) GDF-9还可以模拟卵母细胞抑制颗粒细胞分化的作用。去除卵母细胞的卵泡不能生长, 反而发生黄素化[6][7]。Vitt[8]在颗粒细胞培养液中加入GDF-9, 发现GDF-9抑制促卵泡成熟激素诱导的孕激素和雌二醇合成和LH受体形成, 同时促卵泡成熟激素诱导的cAMP合成也减少。Yamamoto[9]发现在卵泡发育的后期, GDF-9抑制卵泡细胞的提前黄素化。卵泡发育的不同阶段, GDF-9的表达水平差异很大。Elvia[5]发现始基卵泡的卵母细胞不合成GDF-9, 3a期卵泡开始出现低水平GDF-9, 3b期卵泡的GDF-9浓度增加, 生长完全的窦前卵泡的卵母细胞GDF-9染色浓度更高, 在大窦卵泡和排卵前卵泡的卵母细胞中也可以清楚看到GDF-9染色。本实验在体外培养过程不同时间点比较体内与体外发育的卵母细胞GDF-9基因表达, 以期了解体外发育的卵母细胞GDF-9基因表达变化特点以及对卵母细胞成熟的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 出生D10雌性昆明小鼠, 与母鼠共同喂养, 参照SPF喂养标准, 12 h照明、12 h黑暗交替进行。

1.1.2 主要仪器和器皿 体视显微镜、热台(NIKON公司), 低温高速离心机(BECKMAN公司), 超低温冰箱(SANYO), PCR扩增自动循环仪(Applied Biosystem公司), 稳压电泳仪、水平电泳槽、全自动凝胶成像仪(BIO-RAD公司), 紫外分光光度计(BIOCHORM公司)。

1.1.3 实验试剂 重组人促性腺激素(Serono公司), 胎牛血清、人绒毛膜促性腺激素、表皮生长因子(EGF)、青霉素、链霉素; 低糖 α -MEM、胰岛素、转铁蛋白、硒、消毒矿物油(GIBCOL公司), 细胞裂解液(0.5%NP-40, 10 mmol/L Tris-HCl, pH=8.0, 10 mmol/L NaCl, 3 mmol/L MgCl₂), Superscript III, Trizol, 多聚(dT)18引物, dNTP, 15 \times 逆转录缓冲液, 10 \times PCR缓冲液, Taq酶, 25 mmol/L MgCl₂, 100 bp DNA marker, AMV RNA酶抑制剂, 溴化乙锭, 0.5% Pronase, 磷酸盐缓冲液(PBS), TAE, 琼脂糖, 加样缓冲液(INVITROGEN公司)。引物合成和序列分析: 上海博亚生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 窦前卵泡的体外培养

1.2.1.1 机械方法分离窦前卵泡 出生D10小鼠经颈椎脱臼处死,取出双侧卵巢,α-MEM+10%FBS洗涤3次,37℃热台上,体视显微镜下,使用1 ml注射器25G针头机械分离出单个卵泡,尽量维持卵泡完整。

1.2.1.2 选择基底膜完整、形态好的窦前卵泡进行培养 Falcon 3001培养皿中做10个培养液滴,每个液滴20 μl,矿物油覆盖,2~4个卵泡移入一个液滴,37℃、5%CO₂(V/V)、100%湿度培养12 d,隔天换液10 μl;每日倒置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天在培养液中加入2.5 IU/ml绒毛膜促性腺激素、5 ng/ml表皮生长因子,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,在倒置显微镜下测量卵母细胞直径,评定卵母细胞是否成熟。

1.2.2 卵母细胞GDF-9基因表达的测定

1.2.2.1 卵母细胞RNA提取 体外发育组:体外培养D2、D4、D6、D8、D10、D12分离卵母细胞各10个,用直径稍大于卵母细胞的玻璃吸管反复吹打去掉卵丘细胞;体内发育组:分别于小鼠出生后D12、D14、D16、D18、D20、D22颈椎脱臼处死,机械方法分离靠近卵巢门的卵泡各10个,去掉卵丘细胞。两组卵母细胞分别移入0.5% Pronase液滴中消化15 s去除透明带,PBS中冲洗3次;裂解液10 μl加入0.2 ml PCR管中,将单个卵母细胞移入,-80℃保存;体内生长D12、D14、D16、D18、D20、D22与体外培养D2、D4、D6、D8、D10、D12时间对应。

1.2.2.2 卵母细胞mRNA逆转录 使用Superscript III,20 μl混合液 25℃×25 min,50℃×60 min,70℃×15 min。按照试剂说明进行逆转录操作合成cDNA,逆转录产物-20℃保存。

1.2.2.3 引物合成 内参照选择管家基因β-actin,Genbank中找到小鼠GDF-9、β-actin的mRNA序列,使用OLIGO6.0引物设计软件设计上、下游引物。GDF-9上、下游引物分别为:5' AGCAGAAGTCACCT CTACAATAC 3'和5' GTGTCGTTGAGATACAAGA TGA3';β-actin上、下游引物分别为:5' TCGTGGGCC GCTCTAGGCAC 3'和5' TGGCCTTAGGGTTCAGG GGG 3',引物由上海博亚生物公司合成。

1.2.2.4 卵母细胞cDNA进行多聚酶链反应扩增 总体积50 μl反应液,包括10×Buffer 5 μl、MgCl₂(25 mmol/L)3 μl、dNTP Mix(10 mmol/L)1 μl、引物各1 μl,Taq 酶(5 U/μl)0.4 μl,模板cDNA 20 μl。瞬时离心后,设定PCR扩增仪程序:预变性94℃×2 min;变性95℃×30 s;退火56~60℃(β-actin为60℃,GDF-9为56℃)×40 s;循环30~35周期后(β-actin为30周期,GDF-9为35周期)72℃×30 s延长。扩增产物-20℃保存。

1.2.2.5 PCR产物凝胶电泳 1%琼脂糖,加入10 μl溴化乙锭混匀,10×上样缓冲液1 μl与9 μl PCR产物混匀,分别加入加样孔中,同时加入100 bp DNA marker。剩余PCR产物进行测序。恒压100 V电泳30 min,应用计算机全自动图像分析仪测量PCR产物电泳条带的面积(AREA)和平均光密度值(OPTDM),获得几何平均光密度(OPIDI=AREA×OPTDM)。基因表达用相对光密度表示:检测基因光密度/管家基因光密度。电泳后剩余PCR产物进行序列分析,以确认扩增产物序列。

1.3 统计学处理

使用SPSS10.0统计学软件,采用t检验。

2 结果

2.1 体外培养卵泡成活率、窦腔形成率和卵母细胞成熟率

2.1.1 卵泡成活、窦腔形成和卵母细胞成熟的标准 存活的卵泡表现为卵泡结构完整,彼此联系紧密,卵母细胞形态正常;退化的卵泡表现为基底膜缺损,颗粒细胞松散或游离到卵泡外,卵母细胞逸出卵泡,变形或崩解;窦腔形成的表现:完整的卵泡结构中紧邻卵母细胞区域出现半透明,充满液体的窦腔腔样结构;成熟卵母细胞表现为生殖泡破裂,第一极体排出。

2.1.2 卵泡生长过程形态结构改变 培养第2~3天,卵泡贴壁,固定在培养皿上,不能移动(图1 A);第4天颗粒细胞数目明显增多,培养皿平铺一层细胞(图1B);第5~6天颗粒细胞层增多,颗粒细胞明显越过基底膜生长,难以清晰观察卵母细胞;卵泡逐渐失去球形的三维结构,转变成为煎蛋样外观(图1C);第7~10

天, 卵泡出现颗粒细胞稀疏, 半透明的窦腔样结构(图1 D); 第13天, 黏液团样卵丘逸出, 悬浮在培养液中, 卵丘细胞松散, 放射状排列(图1E)。分离卵丘细胞后见到成熟卵母细胞(图1F)。

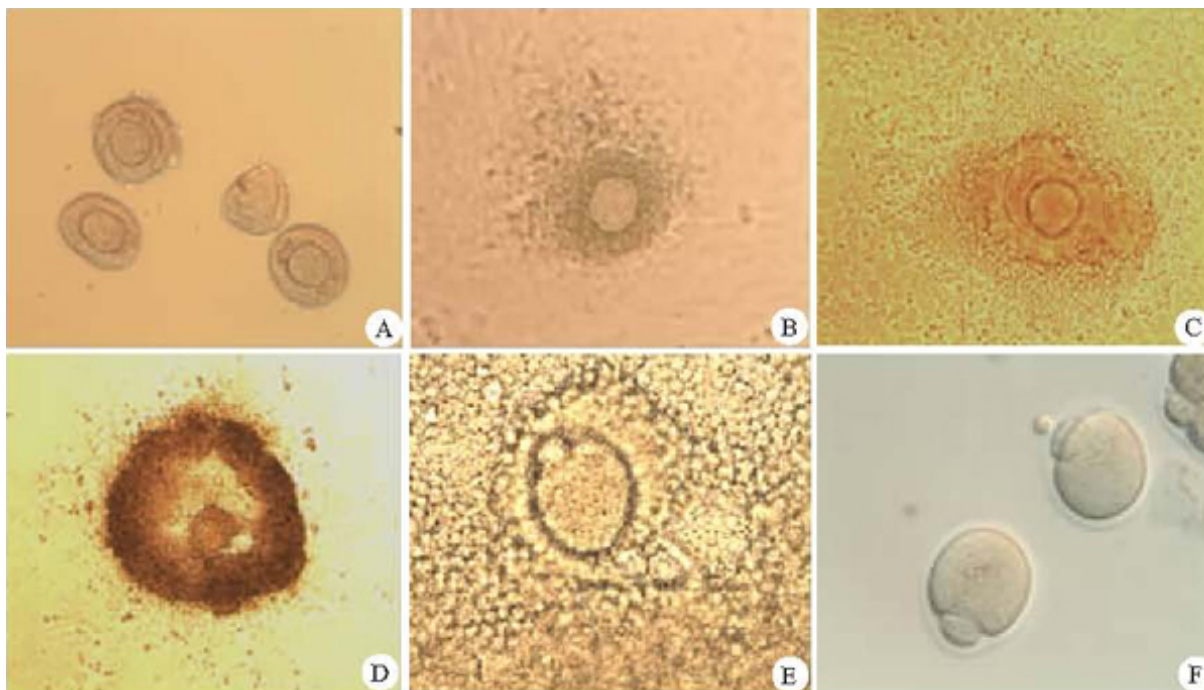


图1 小鼠窦前卵泡体外培养形态变化

Fig.1 Morphological changes of follicles cultured in vitro

A: 2nd day (Original magnification: $\times 200$); B: 4th day (Original magnification: $\times 200$); C: 6th day (Original magnification: $\times 200$); D: 10th day (Original magnification: $\times 100$); E: 13th day (Original magnification: $\times 400$); F: MII oocytes obtained by in vitro culture (Original magnification: $\times 400$)

2.1.3 体外培养卵泡成活率、窦腔形成率和卵母细胞成熟率 第12天观察306个卵泡, 274个卵泡成活(89.5%), 143个窦腔形成(51.8%); 第13天观察, 155个卵母细胞成熟(56.6%)。多数卵泡退化发生于卵泡培养第4天左右。有些卵泡特别是小卵泡, 培养皿平铺细胞少或没有, 基底膜破裂, 细胞结构破坏, 卵母细胞逸出。

2.2 卵母细胞GDF-9基因表达

按实验分组收集各个发育阶段体外发育组和体内发育组卵母细胞, 每阶段5个卵母细胞, 共60个卵母细胞。经过半定量RT-PCR和凝胶电泳得到深浅不同的条带(图2), 用几何平均光密度(OPIDI)作为定量指标, 卵母细胞GDF-9基因表达量用相对光密度(OPIDIGDF-9/ β -actin)表示(表1)。体外发育组和体内发育组各时期卵母细胞 β -actin表达稳定, 各组内和组间比较没有明显差异。体外发育组D2卵母细胞GDF-9表达略高于体内发育组, 但没有统计学差异; 体外发育组D4~6卵母细胞GDF-9表达明显下降, 与体内发育组卵母细胞变化规律相同, 两组间没有显著差异; 体外发育组D8~12卵母细胞GDF-9表达维持在很低的水平, 但是体内发育组卵母细胞GDF-9表达明显上升, 分别与D8和D12两组间GDF-9表达比较, 有显著差异($P < 0.05$)。

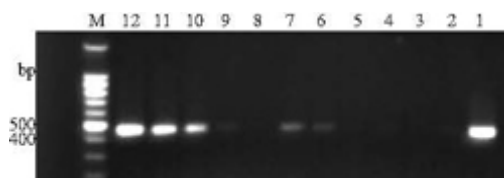


图2 GDF-9凝胶电泳条带图 Fig.2 Electrophoresis of RT-PCR product of GDF-9 Lane 1: 2nd day in vitro; Lane 2: 4th day in vitro; Lane 3: 6th day in vitro; Lane 4: 8th day in vitro; Lane 5: 10th day in vitro; Lane 6: 12th day in vitro; Lane 7: 12th day in vivo; Lane 8: 14th day in vivo; Lane 9: 16th day in vivo; Lane 10: 18th day in vivo; Lane 11: 20th day

表 1 体外发育组和体内发育组卵母细胞 GDF-9 相对光密度比较

Tab.1 Relative GDF-9 mRNA abundance in the oocytes cultured <i>in vitro</i> and grown <i>in vivo</i>							
		D2	D4	D6	D8	D10	D12
<i>In vitro</i>	GDF-9	28650±6311	17281±1236	15370±2543	15758±3371	15843±1546	18040±2001
	β -actin	34601±5223	33206±2700	34331±2311	32395±4849	32012±3033	33823±2997
	GDF-9/ β -actin	0.83±0.08	0.52±0.09	0.45±0.13	0.49±0.09	0.49±0.09	0.68±0.08
		D12	D14	D16	D18	D20	D22
<i>In vivo</i>	GDF-9	18226±2207	15861±3303	16418±4120	21688±3457	24798±3652	29858±2239
	β -actin	34270±4897	32900±3320	34850±1982	35309±1493	34829±2009	34033±4064
	GDF-9/ β -actin	0.64±0.35	0.48±0.10	0.52±0.10	0.66±0.08*	0.72±0.09*	0.91±0.11*

* $P < 0.05$ vs *in vitro* group

3 讨论

本实验培养小鼠窦前卵泡12 d后得到成熟卵母细胞，成熟率达到56.6%，但是卵母细胞核成熟不能完全代表其发育潜能。文献报道体外发育成熟卵母细胞受精后囊胚形成率2%~50%[10][11][12]，低于体内发育成熟卵母细胞。影响卵母细胞和胞质成熟的因素目前并不清楚，以往研究的重点放在卵泡细胞对卵母细胞发育的影响。有人认为卵泡大小不同，其生长速度也不同。当卵泡直径达到300 μm 才能形成窦腔。窦腔形成是卵母细胞成熟的必要条件[13][14]，所以卵泡细胞的增殖和分化在卵母细胞成熟过程中所起的作用非常重要。但是目前人们发现卵母细胞本身才是调控卵泡生长和发育的中枢，特别是卵母细胞分泌GDF-9以旁分泌方式调控卵泡细胞的增殖和分化。Kim[15]曾比较窦卵泡的卵母细胞经过体外成熟和体内成熟后卵母细胞GDF-9基因表达，发现二者差别不大。但是Kim只检测了成熟后卵母细胞的GDF-9表达，并不能代表各时间点生长的卵母细胞GDF-9表达变化。本实验追踪卵母细胞在各发育阶段GDF-9基因表达，发现并不是一成不变的，而是随着发育阶段不同呈曲线变化。

本研究发发现窦前卵泡阶段，体外发育组和体内发育组卵母细胞GDF-9表达量差异不大。卵泡体外培养第2天，卵泡开始贴壁，体外发育组卵母细胞与体内发育组卵母细胞GDF-9有相似的高水平表达；第4天卵泡形成培养皿表层的平铺细胞，体外和体内发育组的卵母细胞都难以检测到GDF-9表达；但是窦前卵泡向窦卵泡转化的过程中，体外发育组和体内发育组卵母细胞GDF-9表达量出现差异。卵泡体外培养第5~6天，卵泡直径明显增加；第7~10天，卵泡内形成窦腔。此阶段体内发育组的卵母细胞GDF-9表达逐渐增加，体外发育组的卵母细胞则不同，从第6~10天都难以检测到GDF-9表达；窦卵泡发育接近成熟时，体外发育组和体内发育组卵母细胞GDF-9表达都增加。卵泡体外培养第12天，卵泡发育到排卵前阶段，体内发育组卵母细胞GDF-9表达达到最高水平；体外发育组卵母细胞检测到较高水平的GDF-9表达，但仍低于体内发育组。卵泡体内发育阶段与卵母细胞GDF-9表达有明显对应的关系，卵母细胞在体内发育到第14天时GDF-9基因表达水平急剧下降，以后缓慢回升。这一时段正是卵泡窦腔形成、颗粒细胞分化成壁层颗粒细胞和卵丘细胞的阶段。低水平的GDF-9表达与颗粒细胞分化存在密切联系，与GDF-9抑制颗粒细胞分化的理论高度契合。但是在某些阶段，体外发育卵母细胞变化规律与体内发育卵母细胞不同。第8~10天，体外发育组的卵母细胞GDF-9持续低表达，相反，体内发育组卵母细胞GDF-9表达水平逐渐增加，这个阶段正是早期窦卵泡形成并逐渐发育成熟的阶段。早窦泡期基因转录活跃，此时mRNA、核糖体、多肽的集聚对于卵母细胞的发育潜能是非常关键的[16]。可能正是由于窦前卵泡向窦卵泡转化过程，体外发育组卵母细胞GDF-9基因表达异常影响了卵母细胞发育潜能。

本研究结果不仅证实了GDF-9作为旁分泌因子对卵泡发育的重要性，而且发现体外发育卵母细胞GDF-9的表达异常对卵母细胞成熟有重要影响。目前并不明确GDF-9通过哪条途径起作用，这些有待进一步探索发现。

参考文献:

- [1] Matzuk MM, Burns KH, Viveiros MM, et al. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation[J]. *Science*, 2002, 296(5576): 2178-80.
- [2] Gilchrist RB, Ritter LJ, Armstrong DT. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals[J]. *Anim Reprod Sci*, 2004, 82-83: 431-46.
- [3] Elvin J A, Yan C, Wang P, et al. Molecular characterization of the follicle defects in the growth differentiation factor 9-deficient ovary[J]. *Mol Endocrinol*, 1999, 13(6): 1018-34.
- [4] Dong J, Albertini DF, Nishimori K, et al. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis[J]. *Nature*, 1996, 383(6600): 531-5.
- [5] Elvin JA, Clark AT, Wang P, et al. Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary[J]. *Mol Endocrinol*, 1999, 13(6): 1035-48.
- [6] El-Fouly MA, Cook B, Nekola M, et al. Role of the ovum in follicular luteinization[J]. *Endocrinology*, 1970, 87(2): 288-93.
- [7] Eppig JJ, Pendola FL, Wigglesworth K. Mouse oocytes suppress cAMP-induced expression of LH receptor mRNA by granulosa cells in vitro[J]. *Mol Reprod Dev*, 1998, 49(3): 327-32.
- [8] Vitt UA, Hayashi M, Klein C, et al. Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles[J]. *Biol Reprod*, 2000, 62(2): 370-7.
- [9] Yamamoto N, Christenson LK, McAllister JM, et al. Growth differentiation factor-9 inhibits 3'5'-adenosine monophosphate-stimulated steroidogenesis in human granulosa and theca cells[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(6): 2849-56.
- [10] Eppig JJ, Schroeder AC. Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation, and fertilization in vitro[J]. *Biol Reprod*, 1989, 41(2): 268-76.
- [11] Liu J, Rybouchkin A, Elst J, et al. Fertilization of mouse oocytes from in vitro matured preantral follicles using classical in vitro fertilization of intracytoplasmic sperm injection[J]. *Biol Reprod*, 2002, 67(2): 575-8.
- [12] Adam AA, Takahashi Y, Katagiri S, et al. In vitro culture of mouse preantral follicles using membrane inserts and developmental competence of in vitro ovulated oocytes [J]. *J Reprod Dev*, 2004, 50(5): 579-86.
- [13] Bishonga C, Takahashi Y, Katagiri S, et al. In vitro growth of mouse ovarian preantral follicles and the capacity of their oocytes to develop to the blastocyst stage [J]. *J Vet Med Sci*, 2001, 63(6): 619-24.
- [14] Boland NI, Humpherson PG, Leese HJ, et al. Pattern of lactate production and steroidogenesis during growth and maturation of mouse ovarian follicles in vitro[J]. *Biol Reprod*, 1993, 48(4): 798-806.
- [15] Kim DH, Ko DS, Lee HC, et al. Comparison of maturation, fertilization, development, and gene expression of mouse oocytes grown in vitro and in vivo[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2004, 21(7): 233-40.
- [16] Fair T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence[J]. *Anim Reprod Sci*, 2003, 78(3-4): 203-16.

