

次黄嘌呤对猪卵母细胞体外自发成熟抑制作用的研究*

苏友强¹ 夏国良¹ 陈勇² 赫晨¹ 傅国栋¹

(¹ 中国农业大学生物学院, 北京 100094;

² 农业部饲料工业中心, 北京 100094)

摘要 利用猪卵母细胞体外无血清培养技术, 研究了次黄嘌呤(HX)对猪卵母细胞体外自发成熟的抑制作用。猪卵丘-卵母细胞复合体(COC)和裸卵母细胞(DO)取自初情期猪卵巢, 培养在M-199培养液中, 并施以各种处理。培养不同时间后, 观察卵母细胞核成熟(GVBD)情况。实验结果表明: (1)HX(1-4mmol/L)对猪COC的自发成熟具有抑制作用, 且具有剂量依赖关系。4mmol/L的HX对COC和DO自发成熟的抑制作用无明显差异($P > 0.05$); (2)HX对COC的自发成熟的抑制作用, 随培养时间的延长而减弱; (3)COC在含有4mmol/L HX的M-199培养液中培养24h后转移到不含HX的培养液中继续培养时, 仍能够自发成熟。在体外, HX能够可逆地部分抑制猪卵母细胞体外自发成熟, 该作用具有剂量依赖性。

关键词 次黄嘌呤, 抑制作用, 猪卵母细胞, 自发成熟

哺乳动物的卵母细胞, 在动物出生前后到初情期排卵前促性腺激素峰作用之前, 一直停滞在第一次减数分裂前期的双线期, 此期的卵母细胞核, 表现为核膜完整, 染色质高度疏松, 称为生发泡(germinal vesicle, GV)。排卵前, 在促性腺激素峰作用下, 卵母细胞减数分裂恢复, 核膜消失, 生发泡破裂(germinal vesicle breakdown, GVBD)。然而, 促性腺激素的上述作用机制, 迄今尚不十分清楚。有腔卵泡中处于GV期的卵母细胞, 当从卵泡液中释放到不含激素的培养液中培养时, 也能够恢复减数分裂, 这种现象称为自发成熟(spontaneous maturation)^[1]。卵母细胞自发成熟现象表明, 卵泡液中含有能够抑制卵母细胞成熟的物质。已有的研究表明, 次黄嘌呤(HX)是卵泡液低分子量组份中能够抑制卵母细胞成熟的主要成份^[2]。猪卵泡液中HX的浓度为1.41mmol/L^[2]。HX在1-6mmol/L浓度范围内, 能够剂量依赖性抑制猪裸卵母细胞(DO)的自发成熟^[3]。而HX对卵丘-卵母细胞复合体(COC)有无抑制作用, 尚无报道。由于卵丘细胞与卵母细胞之间具有缝隙连接(gapjunction); 是卵母细胞与卵泡体细胞间进行信息传递的中介。因此, 卵丘细胞在卵母细胞成熟调控中起重要作用。已有的报道表明, 一些因素可诱导小鼠卵丘细胞分泌一种促卵母细胞成熟因子, 并在人的卵泡液中提纯了该物质^[4-6]。因此, 本实验拟就HX对猪COC的抑制作用及可逆性进行研究, 并与HX对DO的抑制作用进行比较。以期建立一种能够模拟体内卵泡环境的猪CEO体外培养模型, 进而研究促性腺激素促卵母细胞成熟的作用及机制, 为提高卵母细胞体外成熟技术提供理论依据。

* 国家自然科学基金资助项目(39670531)

** 收稿日期 1997-11-20。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 次黄嘌呤, 牛血清白蛋白 V 片段(BSA), 谷氨酰氨(Glu), 地衣红均为 SIGMA 公司产品。丙酮酸钠, M-199 培养基为 GIBCO 公司产品。Dulbecco 氏 PBS(-) 为日本制药株式会社产品。

1.2 实验用猪卵巢 猪卵巢取自屠宰的初情期青年母猪, 放在 37.5~39℃ 的保温瓶内, 于宰后 1.5~2h 运回实验室。

1.3 卵母细胞的分离与无血清培养 卵巢经去除周围的结缔组织和血污后, 在含有 10 万 IU/L 青霉素, 10 万 IU/L 链霉素, 38.5℃ 的 PBS 溶液(0.01mol/L, pH7.4) 中清洗 5 遍, 再用含有 4mmol/L 的 M-199 培养液(其中含有 0.3% BSA, 2mmol/L Glu, 0.23mmol/L 丙酮酸钠, 10 万 IU/L 青霉素, 10 万 IU/L 链霉素) 中清洗 3 遍。之后, 用尖头手术刀片将卵巢上直径为 3~5mm 的卵泡刺破, 释放出其中的 COC。在解剖镜下选择胞质均匀呈黑色, 外面紧密包裹 3~4 层卵丘细胞的 COC(见图 1A)。在 38.5℃ 的上述培养液中漂洗 3 遍后, 以 20~30 个 COC/孔的密度放到 24 孔培养板(CORNING) 内, 每孔含有 500 μ l 培养液, 在 38.5℃ 5% CO₂、95% 空气、饱和湿度的二氧化碳培养箱内培养。

1.4 实验处理 处理 1: COC 在含有不同浓度 HX 的培养液中培养 24h 并观察核成熟情况; COC DO 在含有 4mmol/L HX 的培养液中培养 24h, 比较二者核成熟情况。处理 2: COC 在含有 4mmol/L HX 的培养液中培养不同时间, 分别观察核成熟情况。处理 3: COC 在含有 4mmol/L HX 的培养液中培养 24h 后, 转移到不含 HX 的培养液中继续培养 24h。其间每 6h 检查一次核成熟情况; 或者 COC 只在不含 HX 的培养液中培养 24h, 亦每 6h 检查一次核成熟情况。

1.5 卵母细胞核成熟情况的观察 COC 培养结束后, 除去卵丘细胞, 将得到的 DO 在 Zake 固定液(乙醇: 冰醋酸= 3: 1) 中固定 3~4d 后, 用 1% 的乙酸地衣红染液染色, 镜检, 以 GVBD(见图 1C~D) 作为卵母细胞核成熟的标志。

1.6 数据处理 实验中每个处理重复 3 次, 结果以平均数 \pm 标准误表示。均数差异显著性检验采用方差分析。

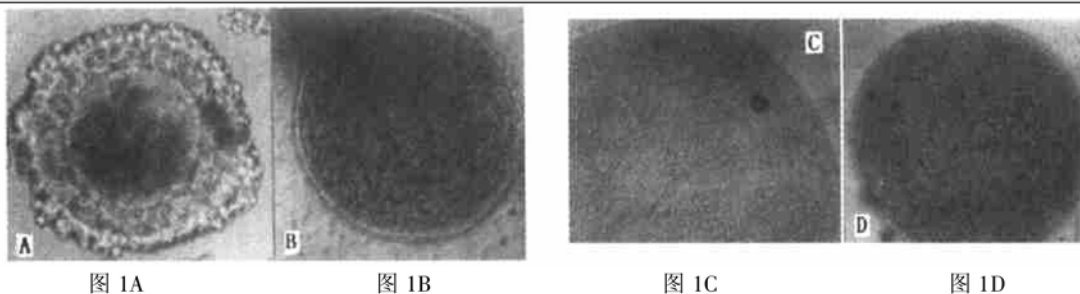


图 1 猪 COC 及猪卵母细胞减数分裂不同时期的显微照片($\times 400$)

A: 猪 COC B: GV 期的卵母细胞 C- D: 已发生 GVBD 的卵母细胞 C: 终变期 D: 后期 I
Fig. 1 Photomicrographs of pig COC used in this experiment and oocytes at different meiotic stages($\times 400$). A: Pig COC; B: Oocyte at GV stage; C- D: Oocytes at the stage of GVBD; C: Diakinesis; D: Anaphase I.

2 结果

2.1 次黄嘌呤对猪卵母细胞自发成熟的作用 COC 在含有不同浓度 HX(0, 1, 2, 4mmol/L) 的 M-199 培养液中培养 24h, GVBD 发生情况见图 2。HX(1-4mmol/L) 对猪 COC 自发成熟具有抑制作用, 且具有剂量依赖性。在 2mmol/L、4mmol/L HX 作用下, GVBD 发生率为 $44.4\% \pm 5.67\%$ 、 $26.9\% \pm 5.05\%$, 与对照组 ($69.7\% \pm 1.56\%$) 相比差异显著 ($P < 0.05$)。4mmol/L HX 的作用效果明显高于 2mmol/L 的 HX 作用 ($P < 0.05$)。

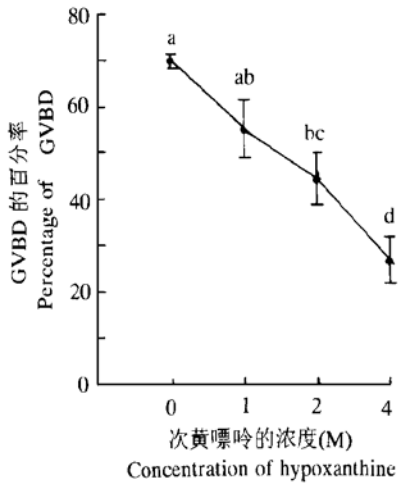


图 2 次黄嘌呤对猪 COC 自发成熟的抑制作用
* 标有不同字母的组间差异显著 ($P < 0.05$)

Fig. 2 Inhibitory effects of hypoxanthine on the spontaneous maturation of pig COC

* Groups with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

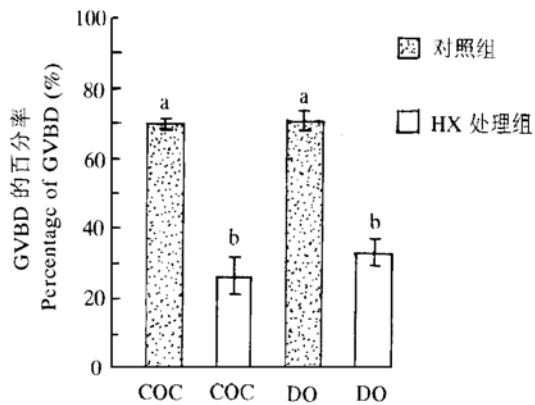


图 3 次黄嘌呤对猪 COC 和 DO 自发成熟的抑制作用

Fig. 3 Inhibitory effect of hypoxanthine on the spontaneous maturation of pig COC and DO

4mmol/L HX 对猪 COC 和 DO 自发成熟的抑制作用无明显差异 ($P > 0.05$), GVBD 发生率为 $26.9\% \pm 5.05\%$ 、 $34.1\% \pm 3.77\%$ 。见图 3。

2.2 次黄嘌呤作用不同时间对猪 COC 自发成熟的抑制作用 4mmol/L HX 作用于 COC 不同时间, GVBD 发生情况见图 4。4mmol/L HX 作用 24h、48h、72h, GVBD 发生率分别为 $26.9\% \pm 5.05\%$ 、 $44.2\% \pm 2.23\%$ 、 $63.9\% \pm 3.18\%$ 。显著地低于各自的对照组 (GVBD 发生率分别为 $69.7\% \pm 1.56\%$ 、 $74.8\% \pm 0.59\%$ 、 $87.9\% \pm 1.62\%$)。HX 的抑制作用随作用时间延长而明显减弱。

2.3 次黄嘌呤对猪 COC 自发成熟抑制作用的可逆性 COC 在不含 HX 的 M-199 培养液中培养 24h, 其间 GVBD 发生情况见图 5A。培养至 6~12h 时, 部分卵母细胞开始成熟, GVBD 发生率分别为 6h: $34.6\% \pm 1.98\%$, 12h: $35.0\% \pm 2.57\%$, 均高于 ($P < 0.05$) 0h 的水平 ($9.21\% \pm 0.87\%$)。GVBD 发生率在 18~24h 达到最高水平, 分别为 18h: $68.6\% \pm 1.98\%$, 24h: $73.6\% \pm 2.40\%$, 均高于 ($P < 0.05$) 前期的水平。COC 在含 4mmol/L HX 的培养液中培养 24h 后, 然后转移到不含 HX 的培养液中继续培养 24h, 其间 GVBD 发生情况见图 5B。COC 在转移到不含 HX 的培养液中继续培养时, 仍能够发生 GVBD。继续培养至 6h, GVBD

发生率为 $81.2\% \pm 2.59\%$, 已达到图 5A 中 24h 的水平, 在之后的 12~ 24h 培养期间, 绝大多数已发生 GVBD。

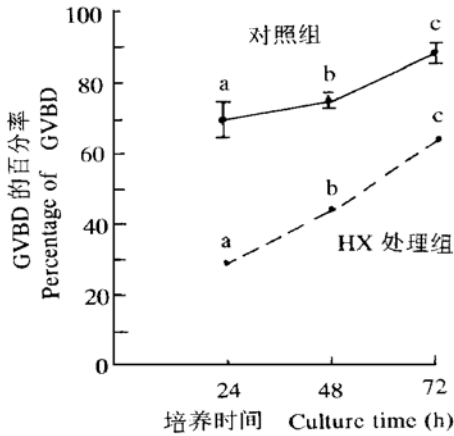


图 4 次黄嘌呤(HX)处理不同时间对猪 COC 自发成熟的作用

Fig. 4 Effects of treating different times with HX on the spontaneous maturation of pig COC

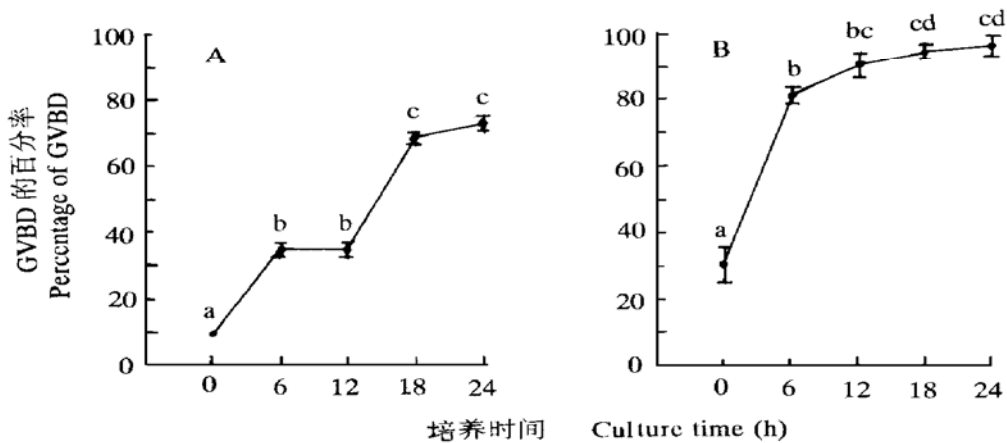


图 5A

图 5B

图 5 次黄嘌呤对猪 COC 自发成熟抑制作用的可逆性

Fig. 5 Reversibility of inhibitory action of hypoxanthine on the spontaneous maturation of pig COC

3 讨论

有报道表明, HX 是卵泡液低分子量组份中能够抑制卵母细胞成熟的重要成份。本实验研究表明, 2~ 4mmol/L 的 HX 可以可逆地抑制猪 COC 的自发成熟; 4mmol/L HX 作用 24h 抑制效果最佳。因此, 该模型可以用来模拟卵泡环境进行有关的研究。这与在其他动物的报道相类似。小鼠卵泡液中 HX 的浓度为 2~ 4mmol/L; 该浓度的 HX, 可抑制小鼠卵母细胞的自发成熟^[7]。猪卵泡液中 HX 的浓度为 1.41mmol/L^[21], 该浓度的 HX, 亦可抑制小鼠卵母细胞的自发成熟^[7]。HX 抑制卵母细胞自发成熟的作用, 在奶牛、猴、大鼠亦有报道。

4mmol/L HX 对猪 COC 和 DO 的抑制作用没有显著的差异, 这表明, 在本培养体系中, 卵

丘细胞的存在对 HX 抑制猪卵母细胞的作用没有显著的影响。HX 对猪 COC 自发成熟的抑制作用是呈时间依赖性的,其抑制作用随时间的延长而减弱。这可能与培养过程中 HX 的降解有关。HX 可以被 COC 降解为尿酸^[8];卵丘细胞和卵母细胞都有降解 HX 的能力,而只有未被降解的 HX,才能抑制卵母细胞的自发成熟^[8]。HX 对猪卵母细胞成熟的抑制作用,与卵母细胞内的 cAMP 的水平有关。已知 cAMP 可以抑制卵母细胞成熟;而 HX 可以抑制磷酸二酯酶(PDE)的活性,使卵母细胞内的 cAMP 处于高浓度状态,从而抑制卵母细胞成熟^[9]。

猪 COC 在 4mmol/L HX 的培养液中培养 24h 后,再转移到不含 HX 的培养液中继续培养时仍能恢复减数分裂,表明 HX 对猪 COC 的抑制作用是可逆的。但有趣的是,在转移后继续培养的短时间内(6~12h),既有很大比例的 COC 发生 GVBD;COC 只在不含 HX 的培养液中培养时,在 6~12h 内也有一定比例的卵母细胞发生 GVBD(由于取卵过程中,COC 一直处于含有 4mmol/L HX 的培养液中,虽然开始培养时,直接放在不含 HX 的培养液中,但仍有一个从含 HX 到不含 HX 培养环境的转移过程。而对于 DO 却不存在上述现象。DO 在不含 HX 的培养液中培养时,6~12h 没有卵母细胞发生 GVBD;在转移后继续培养的 6~12h 也只有很小比例的卵母细胞发生 GVBD^[10]。上述差别可能与卵丘细胞内 cAMP 水平的变化有关。COC 在转移到不含 HX 的培养环境中时,由于解除了 HX 的抑制,PDE 的活性逐渐恢复,因而使 cAMP 的浓度迅速下降。而卵丘细胞内 cAMP 水平的变化,可能诱导产生了某些促卵母细胞成熟因子。已有的研究表明,卵丘细胞内 cAMP 水平的动态变化与卵母细胞成熟及卵丘扩展变化密切相关^[11]。而在本实验中,HX 撤消后,卵丘细胞、卵母细胞内 cAMP 水平的变化情况还有待于进行更深入的研究。

参 考 文 献

- 1 Pincus G, Enzmann EV. The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. I. The activation of ovarian eggs. *J Exp Med*, 1935, 62: 655~ 675
- 2 Downs SM, Coleman DL, Ward- Bailey PF, et al. Hypoxanthine is the principal inhibitor of murine oocyte maturation in a low molecular weight fraction of porcine follicular fluid. *Proc Natl Acad Sci, U. S. A.* 1985, 82: 454~ 458
- 3 Miyano T, Ebihara M, Goto Y, et al. Inhibitory action of hypoxanthine on meiotic resumption of denuded pig follicular oocytes *in vitro*. *J Exp Zool*, 1995, 273: 70~ 75
- 4 Xia GL, Byskov AG, Anderson CY. Cumulus cells secrete a meiosis- inducing substance by stimulating with forskolin and dibutyric cyclic adenosine monophosphate. *Mol Reprod Dev*, 1994, 39: 17~ 24
- 5 Byskov AG, Anderson CY, Xia GL, et al. Chemical structure of sterols that activate oocyte meiosis. *Nature*, 1995, 374: 559~ 561
- 6 Byskov AG, Anderson CY, Hossaini A, et al. Cumulus cells of oocyte- cumulus complexes secrete a meiosis- activating substance when stimulated with FSH. *Mol Reprod Dev*, 1997, 46: 296~ 305
- 7 Eppig JJ, Ward- Bailey PF, Coleman DL, et al. Hypoxanthine and adenosine in murine ovarian follicular fluid: concentration and activity in maintaining oocyte meiotic arrest. *Biol Reprod*, 1985, 33: 1041~ 1049
- 8 Downs SM, Coleman DL, Eppig JJ. Maintenance of murine oocyte meiotic arrest: uptake and metabolism of hypoxanthine and adenosine by cumulus cell- enclosed and denuded oocytes. *Devol Biol*, 1986, 117: 174~ 183

- 9 Downs SM. Purine control of mouse oocyte maturation: evidence that nonmetabolized hypoxanthine maintains meiotic arrest. *Mol Reprod Devol*, 1993, 35: 82~ 94
- 10 Downs SM, Daniel SAJ, Bornslaeger EA, 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
- 11 夏国良, 菊地和弘, 居在家义昭. 猪卵丘细胞和卵母细胞内 cAMP 的动态变化与卵丘扩展和卵母细胞成熟的关系. 中国畜牧兽医学会第十届全国代表大会暨学术论文集(畜牧卷). 中国农业大学出版社, 1996. 196 ~ 202

**STUDIES ON THE INHIBITORY EFFECT OF HYPOXANTHINE
ON THE SPONTANEOUS MEIOTIC MATURATION OF
PORCINE OOCYTES *IN VITRO***

Su Youqiang, Xia Guoliang, Chen Yong^{*}, He Chen, Fu Guodong
(*College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094*)
(* *Feed Industry Center, Ministry of Agriculture, Beijing 100094*)

Abstract

Using the serum-free culture technique for pig oocyte, the inhibitory effect of hypoxanthine (HX) on the spontaneous meiotic maturation of porcine oocytes was investigated. Pig cumulus-oocyte complexes and denuded oocytes (COC and DO) were obtained from the ovaries of prepubertal gilts and cultured in medium 199. Different treatments were carried out on the oocytes during the culture. The incidence of germinal vesicle breakdown (GVBD) was examined at the end of the culture. The results showed: (1) HX, at the concentration of 1-4 mmol/L, could significantly inhibit the spontaneous maturation of pig COC in a dose-dependent manner. The inhibitory effect of 4 mmol/L HX on COC was not different from that on DO. (2) The inhibitory effect of HX (4 mmol/L) on COC decreased in a time-dependent manner within the 72-hour culture period. (3) COC still could mature spontaneously in the following subsequent culture period when transferred from HX-supplemented medium to HX-free medium. These results indicated that HX could partially inhibit the spontaneous meiotic maturation of pig oocytes *in vitro* in a dose-dependent manner; This inhibitory effect is reversible.

Key words Hypoxanthine, Inhibitory effect, Pig oocytes, Spontaneous maturation