

组织切片法观察昆明白小鼠卵丘扩展与卵母细胞成熟的关系

陈勇 夏国良 王海滨 苏友强 傅国栋

(中国农业大学生物学院)

摘要 本实验应用组织切片法探讨了体内正常生理条件下昆明白小鼠卵巢内卵丘扩展与卵母细胞成熟的关系。初情期前小鼠注射孕马血清促性腺激素(PMSG), 48 h 后注射人绒毛膜促性腺激素(HCG), 于注射 HCG 后不同时间取出卵巢进行组织切片。注射 HCG 后 1 h, 卵丘细胞开始扩展, 此时卵母细胞核膜完整, 即未发生生发泡破裂(GVBD); 注射 HCG 后 3 h, 大部分(> 70%) 大有腔卵泡中卵母细胞发生 GVBD, 此时卵丘处于 2 级扩展状态。卵丘完全扩展发生在注射 HCG 后 9 h, 而 PB1 的排出是从 12 h 开始的。结果表明: 在小鼠体内, 卵丘开始扩展先于卵母细胞成熟, 但卵母细胞成熟并不需要卵丘完全扩展; 促性腺激素能促进卵泡发育及卵母细胞成熟, 同时也具有促使卵泡退化的功能。

关键词 昆明白小鼠; 卵母细胞成熟; 卵丘扩展; 组织切片

分类号 Q 492.5

Histologic Study of the Relationship between Cumulus Expansion and Oocyte Maturation in the Kunming White Mouse

Chen Yong Xia Guoliang Wang Haibin Su Youqiang Fu Guodong

(College of Biology, CAU)

Abstract The timing of cumulus cell expansion and oocyte maturation was investigated *in vivo*, using H and E stained paraffin sections of ovary isolated from immature Kunming white mice treated with gonadotropins. One hour after the injection of an ovulatory dose of HCG, expansion of cumulus cells in the outer layer of large antral follicles was observed, but oocyte maturation as evidenced by germinal vesicle breakdown (GVBD) was not evident. Three hours after HCG injection, the majority of oocytes in the large antral follicle (70%) had undergone GVBD, but the cumulus cells were not completely expanded at this time. Cumulus expansion appeared to be completed by 9hr after HCG injection, however, oocyte maturation occurred about 3hr later than cumulus expansion. The results indicate that primary cumulus expansion occurred prior to oocyte maturation, whereas cumulus mass complete expansion is not necessary for maturation of oocyte *in vivo*.

Key words Kunming white mouse; oocyte maturation; cumulus expansion; paraffin section

卵母细胞的生长发育及成熟与其周围的滤泡细胞有密切联系, 其中, 卵丘细胞对卵母细胞成熟的作用一直是人们研究的重要内容之一。近几十年来, 卵丘扩展与卵母细胞成熟的关系引

收稿日期: 1998-12-03

国家自然科学基金资助项目(39770396)

陈勇, 北京圆明园西路2号中国农业大学(西校区)农业部饲料工业中心, 100094



起了人们极大兴趣。目前对两者关系的研究主要集中在两种现象发生前后构成卵泡的几种细胞(包括卵丘细胞、颗粒细胞、卵母细胞)的形态结构及合成分泌某种物质能力的变化,以及两种现象在体外不同培养条件下和体内正常生理下发生的时间顺序。但是,这方面研究的许多结果是不一致甚至相互矛盾的。Eppig^[1]的实验表明,在小鼠体内卵母细胞成熟并不需要卵丘扩展,他的实验方法是激素处理小鼠后从大有腔卵泡中分离出卵丘-卵母细胞复合体(CEO)直接观察。但有人认为,卵母细胞与卵丘细胞间间隙连接的中断或减少是卵母细胞成熟的前提,而卵丘扩展可以使卵丘卵母细胞间间隙连接中断或减少,所以卵丘扩展可能是卵母细胞成熟的必要条件^[2,3]。

以上这些实验均采用CEO体外培养的模式或激素处理后从大有腔卵泡中分离出CEO直接观察,所得的结果可能与体内的实际情况有一定差异。本实验通过体内卵泡发育不同阶段的组织切片,直接观察卵丘扩展与卵母细胞成熟的关系,旨在探讨体内正常生理状态下卵母细胞成熟的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

PM SG 购自中国农科院畜牧所,HCG 为丹麦Nunc公司产品,次黄嘌呤(HX),M 199 培养液干粉及丙酮酸钠均从GBCO公司购买,牛血清白蛋白V片断和谷氨酰胺为SIGMA公司产品。

1.2 方法

1.2.1 实验动物 24~28日龄的未性成熟雌性昆明白小鼠,体重15~18g,购自中国科学院遗传所实验动物中心。在25℃左右的环境温度下饲养,自由采食、饮水,光照14h·d⁻¹。

1.2.2 激素处理 购回的小鼠饲养2~4d后,先注射含PM SG 6IU的0.1mL生理盐水,48h后注射含HCG 6IU的0.1mL生理盐水。对照组以0.1mL生理盐水替代HCG。

1.2.3 实验设计 于HCG处理后不同时间脱臼法处死小鼠,按处死时间分为以下几组:0,1,2,3,4,6,9,12,15h。每组有3只小鼠。对照组注射生理盐水后,分别在3,9,15h处死小鼠。

1.2.4 实验步骤 取材固定:不同时间处死小鼠后,将卵巢放入含有HX的M 199培养液(37℃)中,在体视显微镜下剥离除去卵巢外围的结缔组织。剥离干净的卵巢投入Bourn's固定液中室温固定24h。

切片制作:按常规脱水、透明、包埋、切片(切片厚度6μm)方法制作。

染色:苏木素-伊红染色、封片。

2 结果

HCG注射后0~1h,小鼠卵巢中没有形成腔的小卵泡很多,退化的卵泡较少。从注射HCG后3h开始,有腔卵泡逐渐增多,同时退化卵泡数也逐渐增加。若以生理盐水代替HCG注射小鼠,即使在15h也很少有卵泡退化,但有腔卵泡中的卵母细胞也不发生GVBD。

注射HCG后1h,卵丘细胞开始扩展,此时卵母细胞核膜完整(图1-1);注射HCG后3h,大部分(>70%)大有腔卵泡中卵母细胞发生GVBD,此时,卵丘处于2级扩展状态而没有

完全扩展(图 1-2)。注射 HCG 后 9 h, 大部分有腔卵泡中卵丘已完全扩展, 卵丘细胞完全散开并包围在粘液样的基质中(图 1-3)。到 12 h, 一部分发生 GVBD 的卵母细胞已排出第一极体(图 1-4)。

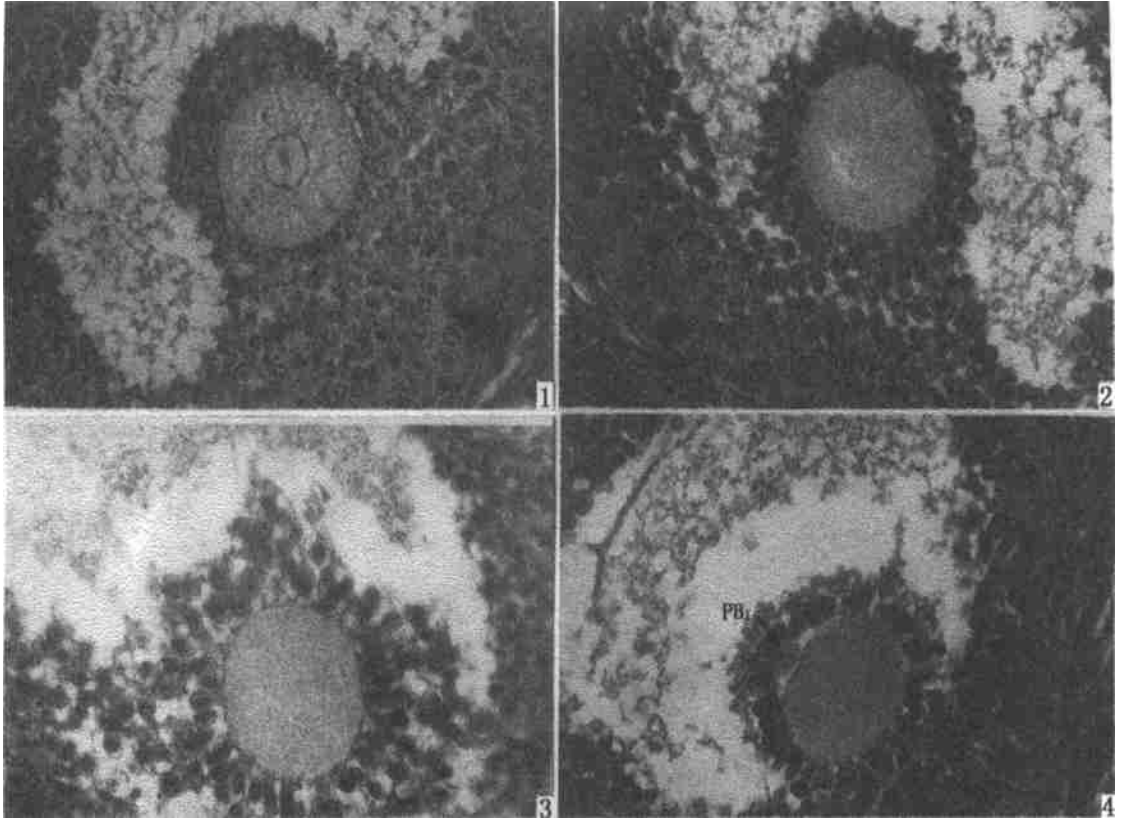


图 1 注射 HCG 后, 小鼠卵丘扩展与卵母细胞成熟的关系

- 1 注射 HCG 后 1 h 的大有腔卵泡, 卵丘细胞开始扩展, 但卵母细胞核膜完整($\times 234$)。
- 2 注射 HCG 后 3 h, 大有腔卵泡卵母细胞核消失, 其卵丘呈 2 级扩展状态($\times 234$)。
- 3 注射 HCG 后 9 h, 大有腔卵泡中卵丘呈 4 级扩展状态($\times 234$)。
- 4 注射 HCG 后 12 h, 有的有腔卵泡中卵母细胞排出 PB_1 , 同时其卵丘完全扩展($\times 234$)。

3 讨论

本实验中, 注射 HCG 后 1 h, 卵丘细胞开始扩展, 但此时卵母细胞尚未发生 GVBD; 注射 HCG 后 3 h, 大部分大有腔卵泡中的卵母细胞发生 GVBD, 此时卵丘处于 2 级扩展状态, 而卵丘完全扩展发生在注射 HCG 后 9 h。该结果表明: 在昆明白小鼠体内, 卵丘开始扩展先于卵母细胞成熟。Eppig^[1]报道, 在小鼠体内卵母细胞的成熟并不需要卵丘的扩展。本实验结果与之不一致。在 Eppig 的实验中, 有腔卵泡中卵母细胞发生 GVBD 时(时间与本实验相同, 均为注射 HCG 后 3 h) 观察不到明显的卵丘扩展, 直到 6 h 才可以观察到外层卵丘开始扩展(1~ 2 级卵丘扩展), 因此得出卵母细胞成熟先于卵丘扩展的结论。分析本实验与 Eppig 实验结果不一致的主要原因可能是: Eppig 实验中所用的方法是激素处理后不同时间通过穿刺卵泡把卵母细

胞释放到体外,然后在显微镜下直接检测卵丘扩展状况和卵母细胞成熟的情况。而在这种方法中,通过吸卵管拣卵的操作过程可能会使已经开始扩展的外层卵丘细胞脱离CEO,因而在显微镜下观察不到卵丘扩展。本实验采用组织切片法,可以清楚地看到卵丘细胞之间紧密程度的变化,所以得出的结论比直接观察CEO得出的结论可能更可靠。

通过本实验,我们认为Vanderhyden等^[4]提出的关于判断卵丘扩展程度的分级方法并不一定能准确地描述卵丘扩展时细胞之间结构和空间的细微变化。如果能找出更好的判断卵丘扩展的方法,肯定会促进人们真正了解卵丘扩展在卵母细胞成熟过程中的作用以及卵母细胞成熟的调节机制。这方面的工作有待进一步的深入。

本实验还表明,促性腺激素能促进卵泡发育及卵母细胞成熟,同时也具有促使卵泡退化的功能。这一结果与目前人们对促性腺激素在卵母细胞发育和成熟中的作用的認識一致。毫无疑问,促性腺激素能促进卵泡发育,但至今人们仍不清楚卵泡发育过程中促性腺激素起作用的确切时间。卵泡退化及闭锁是当前生殖生物学研究的一个热点,而促性腺激素在这个过程中作用尤其引人注目。文献报道,PM SG可以诱导大鼠卵泡退化及闭锁^[5]。李莹辉的实验表明,FSH抑制体外培养的鸡卵泡自发性退化、闭锁^[6]。我们的实验表明HCG可以促使卵泡退化。当然,关于促性腺激素在卵泡退化及闭锁中的作用还了解甚少。这方面的机理尚需更多的研究来证明。

感谢中国农业大学动物医学院组织胚胎教研组周占祥和邓泽沛两位教授提供实验场所及材料,并感谢该教研组王子旭老师的指导和帮助!

参 考 文 献

- 1 Eppig J J. The relationship between cumulus cell-oocyte coupling, oocyte meiotic maturation, and cumulus expansion. *Dev Biol*, 1982, 89: 268~ 272
- 2 Dekel N, Beers W H. Rat oocyte maturation *in vitro*: Relief of cyclic AMP inhibition with gonadotrophins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978, 75: 4369~ 4373
- 3 Moor R M, Smith M W, Dawson M C. Measurement of intercellular coupling between oocyte and cumulus cells using intracellular markers. *Exp Cell Res*, 1980, 126: 15~ 29
- 4 Vanderhyden B C, Caron P J, Buccione R, Eppig J J. Developmental pattern of the secretion of cumulus-expansion enabling factor by the mouse oocytes and the role of oocytes in promoting granulosa cell differentiation. *Dev Biol*, 1990, 140: 307~ 317
- 5 Bill C H. Acute gonadotropin deprivation: I. A model for the study of follicular atresia. *Biol Reprod*, 1981, 24: 913
- 6 李莹辉. 催乳素对鸡卵泡细胞功能和卵泡闭锁调节作用的研究: [博士学位论文]. 中国农业大学, 1996