

## 体内抑制一氧化氮合成酶对小鼠卵母细胞成熟和排卵的影响

张建超 夏国良 崔胜 吕忠显 李美玲 邵育静

(中国农业大学生物学院)

**摘要** 实验研究了一氧化氮合成酶抑制剂L-NAME对昆明白小鼠卵母细胞成熟和排卵的影响。初情期前的昆明白小鼠注射PM SG促进发情,注射hCG促进排卵,并在注射hCG前后各3h注射L-NAME。注射hCG后18h颈椎脱臼处死小鼠,取输卵管冲卵。统计排卵数及卵母细胞的减数分裂情况发现,注射L-NAME后排卵数明显减少,卵母细胞减数分裂恢复异常,大部分排出的卵母细胞处于MI期;PB1的排出率降低,形态异常或退化死亡的卵母细胞数增加。结果直接证明:在体内,NO可促进小鼠卵母细胞的减数分裂的恢复;NO对于小鼠排卵具有重要的促进作用;NO对小鼠卵母细胞质的成熟有重要影响;抑制NO合成后,卵母细胞减数分裂发生异常。

**关键词** 小鼠; 卵母细胞成熟; 一氧化氮; 排卵

**中图分类号** Q492.5; Q492.6

## Inhibiting Nitric Oxide Synthase in vivo Influences Ovation and Oocytes Meiotic Maturation in Mouse

Zhang Jianchao Xia Guoliang Cui Sheng Lü Zhongxian Li Meiling Shao Yujing  
(College of Biological Sciences, CAU)

**Abstract** To examine the effect of inhibiting nitric oxide synthase (NOS) on the number of ovulated oocytes and on the oocytes meiotic maturation, the immature Kunming white mice were super-ovulated with PM SG and hCG. Three hours before and 3 hours after hCG injection, the mice were treated with 1 mmol L-NAME. The mice were killed 18 hours after hCG injection by cervical dislocation, and the oocytes present in the oviduct were flushed out, counted and classified for stages of meiosis. The ovulated oocytes obtained from mouse treated with L-NAME were significantly fewer than that of the control and more oocytes displayed the abnormal meiosis stage, the most oocytes were at metaphase I stage. The results indicate that ovarian nitric oxide is required for maximal ovulation and oocyte meiotic maturation in mouse.

**Key words** mouse; oocyte maturation; nitric oxide; ovulation

自从1987年Palmer和Zgnano分别证实血管内皮衍生因子(EDRF)即为一氧化氮(NO)以来的研究发现,NO具有广泛生理作用:它分子小,易扩散,半衰期短,可通过自分泌和旁分泌起作用,是一种不典型的递质和理想的信号分子<sup>[1,2]</sup>。NO作为一种新型的信息分子,具有独

收稿日期: 2001-03-05

国家杰出青年基金资助(30025032)。

夏国良,北京圆明园西路2号中国农业大学(西校区),100094

特的理化性质和生物学活性。其分子小,与 $\text{Fe}^{2+}$ 亲和力高,具脂溶性,能通过生物膜迅速扩散,既可做第一信使,也可做第二信使,是一种不典型递质和理想的时空信使。目前对NO在心血管、神经、免疫系统中的生理功能已经有了深入的了解。例如,在心血管中,NO可诱导血管的舒张,抑制血小板的聚集,阻止中性粒细胞/血小板粘附于内皮细胞,调节细胞程序性死亡和内皮细胞的屏障功能。神经元产生的NO可作为神经递质。巨噬细胞在对病原微生物产生反应时产生NO抵抗致病微生物。由于NO极不稳定,很难准确测定,因此一氧化氮合酶(NOS)的研究成为NO研究的关键。随着对NOS的蛋白和基因逐渐了解,开始开发相应药物抑制NOS的功能来研究NO的生理作用。其中L-NAME就是一种最常用的抑制剂,可抑制3种一氧化氮合酶的功能。

因为神经元、血管和免疫系统都是卵巢的正常组分,所以NO极有可能是卵巢中重要的生理调节物质。现已证实组成型一氧化氮合酶(eNOS)和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)在大鼠等的卵巢中表达<sup>[3]</sup>,但是对NO在卵巢中的作用却了解不多,尤其是在卵母细胞成熟中的作用更是知之甚少。

本研究利用我国常用的昆明白小鼠品系,通过体内注射NO合酶的抑制剂,抑制卵巢中NO的合成,来探讨在体内生理状态下NO对于小鼠卵母细胞成熟的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

L-谷氨酰胺、次黄嘌呤(HX)、L-NAME和牛血清白蛋白V片段(BSA)均为Sigma公司产品,M-199培养液和丙酮酸钠为GBCO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。

### 1.2 方法

**1.2.1 实验动物** 24~28日龄的未成熟雌性昆明白小鼠30只,体重14~16g,购自中国科学院遗传研究所。室温饲养,自由采食饮水。实验动物分2组,每组15只,分3次重复。处理组腹腔注射PMSG  $0.1\text{ mL}\cdot\text{只}^{-1}$ (即 $100\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ),48h后注射hCG( $10\text{ U}\cdot\text{只}^{-1}$ );在注射hCG前后3h各注射一次L-NAME( $1.5\times 10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ )。对照组PMSG和hCG的注射方法与处理组相同,只是在注射hCG前后各3h注射生理盐水。

**1.2.2 卵母细胞的获取** 注射hCG 18h后,颈椎脱臼法处死小鼠,剖开腹腔,取出卵巢,置于含有 $4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  HX的M-199培养液(以下简称HX培养液,该培养液含BSA 3%、谷氨酰胺 $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、青霉素 $100\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和链霉素 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )中。在体视显微镜下,用5号半针头分离输卵管,撕开膨大部,取出卵母细胞-卵丘细胞复合体,在HX培养液中洗3次后移至4孔培养板(丹麦Nunc公司)内,每孔含1mL加有0.1%透明酯酸酶(SIGMA公司)的HX培养液,在37℃培养箱内培养10min,轻轻摇动,使卵丘细胞分离,统计卵母细胞总数,并观察卵母细胞的生发泡破裂(GVBD)和第一极体(PB1)的排出情况。

**1.2.3 数据处理** Student's t-检验统计分析,结果以平均值±标准误( $M\pm SE$ )表示, $P<0.05$ 为差异显著,每个实验处理重复6次以上。

## 2 结果

### 2.1 L-NAME 对排卵的影响

注射 L-NAME 抑制一氧化氮合成酶活性后, 小鼠排卵数目比对照组明显减少, 分别为  $16.58 \pm 1.8$  和  $24.92 \pm 0.98$ , 二者差异显著 ( $P < 0.05$ )。

### 2.2 L-NAME 对卵母细胞成熟的影响(图 1)

注射 L-NAME 抑制一氧化氮合成酶活性后, 小鼠卵母细胞完成第 1 次减数分裂中期 (M I) 向第 2 次减数分裂中期 (M II) 转型的卵母细胞数量也显著降低, 处于 M I 期的卵母细胞约为  $(46.57 \pm 3.96)\%$ , 明显高于对照组  $(23.03 \pm 3.3)\%$ , 处于 M II 期的卵母细胞约为  $(50.5 \pm 5.4)\%$ , 明显低于对照组 (约为  $75.11 \pm 5.7\%$ ) ( $P < 0.01$ )。

### 2.3 L-NAME 对卵母细胞形态的影响(图 2)

实验组的异常卵母细胞数虽有增加, 但未达到显著水平 ( $P > 0.05$ )。

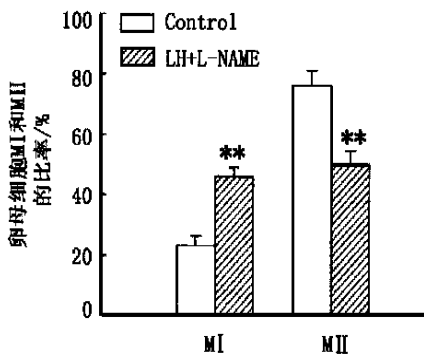


图 1 L-NAME 对体内卵母细胞减数分裂成熟的影响 (\*\*  $P < 0.01$ )

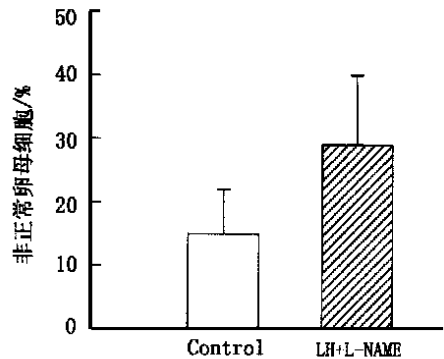


图 2 L-NAME 对体内卵母细胞存活的影响

## 3 讨论

NOS 的免疫组织化学定位发现: eNOS 和 NOS 在大鼠的卵巢卵泡发育过程中表达<sup>[3]</sup>, 提示 NOS 可能在卵巢中起着重要作用。注射 PM SG 和 hCG 以后卵泡中 NOS 表达量明显上升, 说明 NOS 可能参与卵泡的发育和排卵起作用。本实验在注射 hCG 前后注射 L-NAME 后, 发现小鼠排出的卵母细胞减数分裂不正常。大量卵母细胞虽然发生 GVBD 但并没有完成第 1 次减数分裂。进而从功能上直接证明: NO 参与小鼠卵母细胞减数分裂的恢复。该结果与 Jablonka-Shariff 在大鼠中的结果相似<sup>[4]</sup>。虽然 Jablonka-Skariff & Olson 通过对 eNOS 基因敲除小鼠实验也证实 eNOS 基因敲除后影响了小鼠卵母细胞减数分裂<sup>[5]</sup>, 但由于基因之间的相互作用非常复杂, 该实验结果仅说明 eNOS 基因的敲除会影响到小鼠卵母细胞的减数分裂。由于本实验仅是应用了 eNOS 抑制剂, 对于 NOS 在小鼠卵母细胞减数分裂中的作用还不清楚, 特别是 eNOS 和 NOS 在调节卵巢功能的作用仍然未知。

卵母细胞细胞质的成熟具有重要意义,早期胚胎发育依赖于卵母细胞胞质内物质的能量和信息的积累。在鼠中,由于排出的PB1非常明显,常可作为卵母细胞胞质成熟的指标。本实验发现,在抑制体内NO合酶作用后,PB1的排出率下降,说明小鼠卵母细胞的胞质成熟受到影响。对于NO对卵母细胞成熟的机制还有待于进一步研究。

有报道表明注射hCG后,eNOS的表达量在12和20持续增加(分别为5倍和7倍)。NOS的表达水平在卵泡发育过程中没有变化,但在注射hCG后明显上升,在第10天达到最高——10倍<sup>[3]</sup>。这说明NOS可能对排卵起作用。本实验发现,在注射L-NAME的实验组,小鼠排卵数目明显下降,说明NO的确对排卵有重要作用。体外实验表明,抑制NO后可影响PGF2a的分泌,而PGF2a可能是排卵的关键因素。提示在体内NO可能是通过影响PGF2a来影响LH诱导的排卵。Shakorski和Tsafriri证实和田鼠和大鼠腹腔内或卵巢囊内给予NOS抑制物,可抑制大鼠排卵。用特异性抑制剂抑制NOS后,同样抑制排卵<sup>[6]</sup>。关于eNOS和NOS二者在小鼠排卵中的关系还不明确。

总之,本实验利用体内注射一氧化氮合酶的抑制剂,抑制卵巢中NO的合成,在鼠中证实,NO不仅参与卵泡的排卵过程,同时还参与卵母细胞的减数分裂成熟。

### 参 考 文 献

- 1 Palmer R M J, Ferrige A G, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature (Lond)*, 1987, 327: 524~ 526
- 2 刘景生. 细胞信息与调控. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998
- 3 Jablonka-Shariff A, Olson L M. Hormonal regulation of nitric oxide synthases and their cell-specific expression during follicular development in the rat ovary. *Endocrinology* 1997, 138: 460~ 468
- 4 Jablonka-Shariff A, Basuray R, Olson L M. Inhibitors of nitric oxide synthase influence oocyte maturation in rats. *J Soc Gynecol Invest*, 1999, 6: 95~ 101
- 5 Jablonka-Shariff A, Olson L M. The role of nitric oxide in oocyte meiotic maturation and ovulation: meiotic abnormalities of endothelial nitric oxide synthase knock-out mouse oocytes. *Endocrinology* 1998, 139: 2944~ 2954
- 6 Shukovski L, Tsafriri A. The involvement of nitric oxide in the ovulatory process in the rat. *Endocrinology*, 1994, 135(5): 2287~ 2290