基础研究 文章编号:0253-3626(2010)04-0542-03

抑制素 A 及促性腺激素对小鼠未成熟卵母细胞体外成熟的影响

孙玉菡,丘 彦,幸贵邦,孟江萍,胡 敏,秦 芬
(重庆医科大学附属第一医院辅助生殖中心,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨抑制素 A(Inhibin A,INH A)对小鼠未成熟卵母细胞体外成熟(In vitro maturation,IVM)的影响。方法:从孕马血清促性腺激素(Pregnant mare serum gonadotrophin,PMSG)组(使用 PMSG 组,16 例)及无 PMSG 组(未使用 PMSG 组,20 例)获得的生殖泡期(Germinal vescle,GV)卵母细胞在不同浓度 INH A 的培养液中进行体外培养,观察第一极体(The first polar body,PB1)排出和皮质颗粒(Cortical granules,CG)染色情况。结果:PMSG 组获卵数为(17.2 ± 2.6)个/只,无 PMSG 组获卵数为(15.9 ± 1.8)个/只($P>0.05$);PMSG 组与无 PMSG 组的 PB1 率分别为 57.7%、50.7%($P>0.05$)。PMSG 组中 INH A 200、350 ng/ml 组的 PB1 率较对照组高($P<0.05$);无 PMSG 组中各 INH A 组 PB1 率与对照组比较无显著差异($P>0.05$);结论:INH A 和 PMSG 对体外培养 GV 期卵母细胞核成熟有促进作用。

【关键词】抑制素 A;孕马血清促性腺激素;卵母细胞;体外成熟;皮质颗粒
【中国图书分类法分类号】R711.6 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-12-09

The effect of inhibin A and gonadotrophic hormone on the in vitro maturation of mice immature oocytes

SUN Yu-han, et al
(*Assistant Reproductive Centre, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the significance of inhibin A(INH A) in the in vitro maturation. *Methods*: All oocytes extracted were divided into PMSG group(mice's peritoneal cavity was injected with PMSG(pregnant mare serum gonadotrophin) before getting oocytes) and none PMSG group.The germinal vesicle (GV) oocytes isolated from rats were cultured in the INH A solutions at concentrations of 0 (control),50,100,200 and 350 ng/ml IVF plus culture media. Extrusion of the first polar body (PB1) and staining of cortical granules (CG) were observed. *Results*: We can got(17.2 ± 2.6) oocytes /mice with using PMSG,and we can got(15.9 ± 1.8) oocytes /mice without PMSG($P>0.05$). There was no difference in the rate of PB1 between PMSG group and none PMSG group. In PMSG group,INH A solutions at concentrations of 200 ng/ml,350 ng/ml had higer rate of PB1 than that in control group($P<0.05$); In the none PMSG group,each INH A group had no significant difference in the rate of PB1.*Conclusion*:INH A and PMSG maybe played an important role in oocytes maturation from GV phase in vitro.

【Key words】Inhibin A; Pregnant mare serum gonadotrophin; Oocyte; In vitro maturation; Cortical granules

未成熟卵母细胞体外成熟(In vitro maturation, IVM)率、受精率及临床妊娠率的影响因素很多,取卵前是否使用促性腺激素以及培养液的成分改良是研究热点之一。大量研究致力于寻找最佳体外培养系统,以期得到细胞核和细胞质同步成熟,受精率高的卵母细胞。抑制素(Inhibin,INH)是转化生长因子 B 蛋白超家族的一个成员,其主要产生的部位是生殖腺,在卵巢内主要来源是颗粒细胞,它对生殖具有内分泌、旁分泌和自分泌的调节作用[1]。目前有研究显示,INHA 可能促进卵母细胞的成熟和发育。本研究以小鼠未成熟卵母细胞为研究对象,于取卵前 48 h 给或不给小鼠腹腔内注射孕马血清促性腺激素(Pregnant mare serum gonadotrophin,PMSG),将获得的生殖泡(Germinal vescle,GV)期卵母细胞在不同浓度 INH A 的培养系统中进行体外培养,观察未成熟卵母细胞核成熟、胞质成熟率,以探讨 INH A 和促性腺激素对未成熟卵母细胞 IVM 的影响。

作者介绍:孙玉菡(1984-),女,硕士,
研究方向:生殖内分泌与辅助生殖技术。
通讯作者:丘 彦,女,教授,E-mail:cqartq@163.com 。
基金项目:重庆市卫生局中医药科研计划项目(2007-2-25)。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级昆明种雌性小鼠 36 只,8～12 周龄,体质量 23～28 g,用于获取未成熟卵母细胞,购自重庆医科大学实验动物中心。

1.2 实验试剂和仪器

体外受精(In vitro fertilication,IVF)培养液(vitrolife 公司,瑞典),链霉蛋白酶(Roche 公司,德国),INH A(intlab 公司,美国),异硫氰酸荧光素联接的扁豆凝集素(FITC-LCA)(Vector Laboratories 公司,美国),孕马血清促性腺激素(宁波第二激素厂),解剖显微镜(Leica,德国),倒置显微镜(XDS-1,中国),激光共聚焦显微镜(ZEISS,德国)。

1.3 实验方法

1.3.1 未成熟卵母细胞的获取[2] 将健康昆明种雌性小鼠随机分为 2 组 PMSG 组(腹腔内注射 PMSG 10 IU/ 只,共 16 只)和未用 PMSG 组(腹腔内不注射 PMSG 10 IU/ 只,共 20 只),46～48 h 后脱颈法处死,无菌摘取出卵巢,收集 GV 期卵母细胞用于体外成熟培养。

1.3.2 体外成熟培养及分组 培养液分为 5 组 A 组培养液不含 INH A 的对照组;B 组 50 ng/ml INH A 的 IVF 培养液;C 组 100 ng/ml INH A 的 IVF 培养液;D 组 200 ng/ml INH A 的 IVF 培养液;E 组 350 ng/ml INH A 的 IVF 培养液。

1.3.3 观察内容 分别于培养第 16、20、24、36 h 在倒置显微镜下观察第一极体(The first polarbody,PB1)出现。

1.3.4 卵母细胞皮质颗粒(Cortical granules,CG)染色[3] 体外培养 20 h 后,机械吹打各组 PB1 期卵丘细胞,去除颗粒细胞,0.5%链酶蛋白酶去透明带,4%多聚甲醛固定 30 min,0.1% Triton X-100 处理 5 min,10%封闭山羊血清洗 3 次,每次 5 min,100 μg/mlFITC-LCA 避光染色 45 min,37℃孵育,PBS 洗 3 次,每次 5 min,封片。激光共聚焦荧光显微镜下显色。

1.3.5 数据分析 采用 SAS 8.2 统计软件进行 χ^2 和 t 检验。

2 结 果

2.1 促性腺激素对未成熟卵母细胞发育的影响

2.1.1 获卵数目 无 PMSG 组,获卵数(15.9±1.8)个/只;PMSG 组,获卵数(17.2±2.6)个/只,无统计学差异(P>0.05)。

2.1.2 PMSG 对 PB1 发生的影响 无 PMSG 组与 PMSG 组 PB1 率分别为 50.7%、57.7%,差异无显著性(P>0.05)(见表 1、图 1)。

2.1.3 PMSG 对体外成熟卵母细胞 CG 的影响 将 PMSG 组(81 个)和无 PMSG 组(65 个)成熟卵母细胞 CG 荧光染色后大部份细胞破碎溶解,可观察细胞分别为 18、15 个,可观察细胞率较低(22.2%,23.1%)。PMSG 组中 16/18 个(88.9%)均出现环状分布与无皮质颗粒区(Cortical granules free domain,CGFD);无 PMSG 组 10/15 个(66.7%)出现环状分布,其中 8 个(53.3%)出现 CGFD(见图 2)。由于可观察细胞数较少,实验条件有待摸索,未作进一步统计学分析。

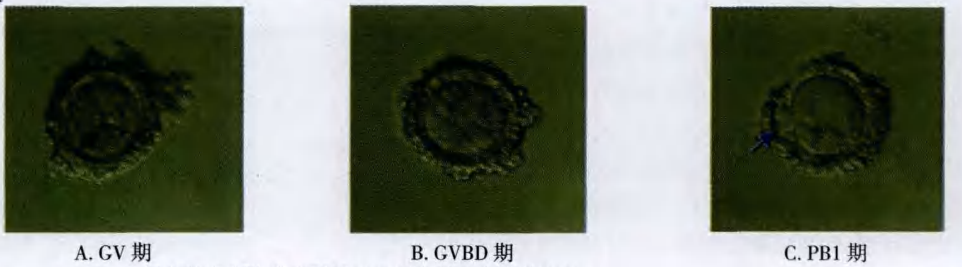
2.2 INH A 对未成熟卵母细胞发育影响的观察

2.2.1 INH A 对 PB1 发生的影响 无 PMSG 组对照组 PB1 率与 INH A 各浓度组无显著性差异(P>0.05);PMSG 组 INH A 为 200、350 ng/ml 组 PB1 率较对照组高(P<0.05);各浓度 INH A 组间无显著差异(P>0.05)。(见表 1、图 1)

表 1 GV 期卵母细胞核成熟情况(体外培养 36 h)

INH A 浓度(ng/ml)	无 PMSG 组		PMSG 组	
	PB1 数(%)	卵母细胞总数(个)	PB1 数(%)	卵母细胞总数(个)
对照	12(42.9)	28	17(44.7)	38
50	14(48.3)	29	16(53.3)	30
100	15(51.7)	29	17(56.7)	30
200	15(53.6)	28	20 (69.0)[a]	29
350	16(57.1)	28	21 (72.4)[a]	29
	72(50.7)	142	90(57.7)	156

a:P<0.05,与对照组比较



A. GV 期 B. GVBD 期 C. PB1 期

黑色箭头所指为生殖泡 GV,蓝色箭头所指为 PB1

图 1 体外培养各个时期的卵细胞形态(×400 倍)



A. 环状分布　　B. CGFD　　C. 均匀分布

红色箭头指示 CG 呈现绿色荧光环，黄色箭头指示 CGFD

图 2　卵母细胞皮质颗粒分布（×400 倍）

3　讨　论

PMSG 是来源于妊娠母马血液的一类促性腺激素，具有卵泡刺激素和黄体生成素两种活性，在卵泡期给予外源性卵泡刺激素能遏制卵泡细胞凋亡，增加卵子的蛋白质合成能力[4]，促进卵泡生长，提高卵母细胞体外发育潜能。Junk[5]等人的研究结果显示取卵前给予促性腺激素对未成熟卵母细胞的细胞核的成熟有促进作用，但本研究观察到无 PMSG 组 PB1 率为 50.7%，PMSG 组 PB1 率为 57.7%，两组无统计学意义（$P>0.05$）。

INH A 是卵泡液中的重要成分，Wen X[6]研究结果显示成熟卵母细胞中 INH A 浓度的变化范围分别为 7.9 ~ 436 ng/ml，并得出结论 INH A 在卵泡生长的整个过程中都有合成且维持一定浓度，并可能是卵母细胞成熟的必需营养物质。生殖泡破裂（Germinal vesicle break down，GVBD）是体外培养 GV 期卵母细胞减数分裂恢复的标志[7]，PB1 排出标志着第一次减数分裂的完成，是卵母细胞核成熟标志。本研究结果显示 无 PMSG 组对照组 PB1 率与各 INH A 浓度组无显著性差异（$P>0.05$）；PMSG 组 INH A 浓度为 200、350 ng/ml 组 PB1 率较对照组高（$P<0.05$）；INH A 各浓度组组间无显著差异（$P>0.05$）。提示 INH A 和促性腺激素对于卵母细胞核成熟（PB1 排出）可能具有促进作用，在生理浓度范围（50 ~ 350 ng/ml）内，较大浓度的 INH A 能促进小鼠卵母细胞细胞核的成熟，这与陈颖[8]等结论一致。

卵母细胞在体外的成熟包括细胞核、细胞质的成熟。CG 是成熟细胞质的重要组成部分。目前，卵母细胞成熟过程中 CG 的分布被越来越多的研究者作为衡量细胞质成熟的指标[9]。GV 期卵母细胞 CG 平均分布，MⅠ期颗粒细胞逐渐向细胞皮质区域迁移，表现为皮质分布，MⅡ期形成细胞膜下单层环状分布。体内成熟卵母细胞表现为周边分布，啮齿类动物卵母细胞临近 PB1 排出的位置出现 CGFD，覆盖纺锤体和染色体分布区域，这是细胞质成熟的重要标志之一[3]。卵母细胞在体外培养时，CG 是否发生与细胞核同步的变化，还影响卵母细胞成熟后的受精及卵裂能力。本实验将 CG 荧光染色后观察到 PMSG 组（88.9%）卵母细胞环状分布率及 CGFD 率较无 PMSG 组（53.3%）高，惜染色后大部份细胞破碎溶解，可观察细胞率较低（22.2%、23.1%），未作统计学分析，INH A 的相关结论有待进一步证实。

本文研究了生理浓度范围的 INH A 对 GV 期卵母细胞体外成熟的影响，较高浓度的 INH A 对 GV 期卵母细胞体外成熟的影响有待进一步探讨。

参　考　文　献

[1] 杨玉健.抑制素、激活素和 FS 在女性生理中研究进展[J].国外医学计划生育分册，2004，23(3)：134-136.

[2] 陈　媛，杨　菁，李　洁，等. 促性腺激素及雌二醇对小鼠卵母细胞体外成熟的影响[J].武汉大学学报（医学版），2007，28(5)：568-572.

[3] 彭宇洪，庄广伦，林健雯，等.小鼠体外发育成熟卵母细胞的胞浆成熟度评估[J].动物学杂志，2006，41(6)：36-40.

[4] Anderiesz C, Ferraretti A P, Magli C, et al. Effect of recombinant human gonadotrophins on human, bovine and murine oocyte meiosis, fertilization and embryonic development in vitro[J].Hum Reprod，2000，15(5)：1140-1148.

[5] Junk S M，Dharmarajan A, Yovich J L. FSH priming impoves oocyte maturation, but priming with FSH or HCG has no effect on subsequent embryonic development in an in vitro maturation program[J]. Theriogenology，2003，59(8)：1741-1749.

[6] Wen X, Tozer A J, Butler S A，et al. Follicle fluid level of inhibin A, inhibin B, and activin A level reflect changes in follicle size but are not independent markers of the oocyte's ability to fertilize[J]. Obstetrics/Gynecology，2006，2(12)：1723-1729.

[7] Eppig J J. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals[J]. Reprod Fertil Develop，1996，8(4)：485-489.

[8] 陈　颖，何方方，王增艳，等.激活素－抑制素－卵泡抑素系统对小鼠卵母细胞体外成熟及早期胚胎发育潜能的影响机制[J].生殖与避孕，2008，3(28)：134-139.

[9] Liu X Y, Mal S F, Miao D Q, et al. Cortical granules behave differently in mouse oocytes matured under different conditions[J]. Hum Reprod，2005，20(12)：3402-3413.

（责任编辑：关蕴良）