

猪卵泡内促卵丘扩展因子的来源

孙兴参^① 岳奎忠^① 马所峰^① 伊亚玲^① 邹义^① 谭景和^{②*}

(^①东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030; ^②山东农业大学动物科学技术学院, 泰安 271018.

* 联系人, E-mail: tanjh@sdau.edu.cn)

摘要 猪卵丘的扩展不依赖于卵母细胞. 因此推测, 猪卵母细胞可能不是卵泡内促卵丘扩展因子(cumulus expansion enabling factor, CEEF)的惟一来源. 实验应用小鼠摘除卵母细胞的卵丘-卵母细胞复合体(oocyctectomized complex, OOX)检验猪透明带、不同质量生发泡期卵母细胞以及卵泡内的其他细胞成分产生 CEEF 的情况. 结果证明: (1) 猪和小鼠的空透明带都不能产生 CEEF. (2) 猪不同质量(A, B, C 三类)未成熟卵母细胞均能分泌 CEEF, 其分泌 CEEF 的能力和 CEEF 活性没有明显差异($P > 0.05$). (3) 猪 3~6 mm 卵泡的 OOX 和小于 1 mm 卵泡的颗粒细胞都有较高的 CEEF 分泌能力, 且此能力不依赖于激素作用; 但 3~6 mm 卵泡的壁颗粒细胞不能分泌 CEEF. (4) 3~6 mm 卵泡的卵泡液中含有 CEEF, 但其活性与培养时所用的卵泡液浓度有关, 浓度过高 CEEF 活性反而下降. (5) 进行培养时必须添加促性腺激素, 小鼠 OOX 才发生扩展, 说明由猪卵母细胞和卵泡成分产生的 CEEF 的促卵丘扩展作用依赖于促性腺激素.

关键词 促卵丘扩展因子 卵丘扩展 卵泡 卵母细胞 猪

小鼠卵母细胞在调节卵丘扩展方面起着重要作用, 从卵丘-卵母细胞复合体(cumulus-oocyte complex, COC)中摘除卵母细胞可以阻止 FSH 和 EGF 诱导的卵丘扩展^[1,2]. 利用裸卵条件化培养基可以解除卵母细胞造成的影响^[1]. 这说明, 卵母细胞能分泌一种可溶性的促卵丘扩展因子(cumulus expansion enabling factor, CEEF). 猪和牛的卵母细胞也能分泌 CEEF, 在 FSH 参与下能使小鼠摘除卵母细胞的卵丘-卵母细胞复合体(oocyctectomized complex, OOX)发生扩展; 但在这两种动物, 摘除卵丘-卵母细胞复合体中的卵母细胞并不影响卵丘扩展^[3~6]. 我们先前的研究也证明, 猪卵丘扩展不依赖于卵母细胞, 因为卵母细胞体外成熟后, 即使卵丘发生 3~4 级扩展, 其中也有死亡的卵母细胞^[7]. 猪 OOX 的扩展能力并不是由于存留在卵丘中的卵母细胞 CEEF 所引起的, 因为即使在加 FSH 之前先培养 32 h 使可弥散因子耗竭时, 它们照样扩展^[6]. 因此, 这些 CEEF 很可能是由卵丘细胞重新产生的.

Prochazka 等人^[8]证明, 猪卵丘和卵泡壁颗粒细胞都能产生促进卵丘扩展的 CEEF. 本文研究了猪不同质量卵母细胞、透明带、卵丘细胞、小的有腔卵泡颗粒细胞和卵泡壁颗粒细胞产生 CEEF 的能力, 并报道了不同质量卵母细胞产生 CEEF 的能力及所产生的 CEEF 活性没有差异; 3~6 mm 卵泡壁颗粒细胞不

能产生 CEEF; 3~6 mm 卵泡卵泡液中的 CEEF 活性具有浓度依赖性.

1 材料与方法

(i) 培养液. 基础培养液为含 Earle 盐的 TCM199 (Gibco)加 10%的胎牛血清(FCS). 根据实验需要添加孕马血清促性腺激素(PMSG)和人绒毛膜促性腺激素(hCG)各 10 IU/mL. 操作液是改良的 Dulbecco 磷酸缓冲液(mPBS)加 0.1%聚乙烯醇(PVA).

(ii) 小鼠 OOX 的制备. 控光(早 6:00 至晚 8:00 光照)条件下饲养的 4~6 周龄昆明小鼠, 腹腔注射 10 IU PMSG, 44~46 h 从卵巢卵泡内刺取卵丘-卵母细胞复合体. 选取卵丘细胞层数多的卵丘-卵母细胞复合体, 在显微操作仪下用注射针将复合体内的卵母细胞去除. 因此, 所制备的 OOX 包括空透明带和外面包围的卵丘细胞.

(iii) 制备条件培养基用的各种成分的收集. 自屠宰场收集新鲜猪卵巢, 置于 30~35℃无菌生理盐水中带回实验室. 用生理盐水将卵巢洗涤 3~4 次后, 收集制备条件培养基用的各种卵泡成分.

(1) 未成熟裸卵. 用 10 mL 注射器从卵巢表面抽取直径 3~6 mm 卵泡中的卵泡液, 从其中获得卵丘-卵母细胞复合体. 将所收集的卵丘-卵母细胞复合体按卵丘细胞的层数分为 A(5 层以上卵丘细胞), B(4

层以下卵丘细胞)和 C(裸卵)三类. A, B 两类卵经口吸管反复吹打脱掉卵丘细胞, 制成裸卵.

(2) 猪 OOX. 采用(ii)中的方法将来自猪 3 ~ 6 mm 卵泡的 A 类卵丘-卵母细胞复合体制成去除卵母细胞的 OOX.

(3) 壁颗粒细胞. 在收集卵丘-卵母细胞复合体的同时, 从 3 ~ 6 mm 卵泡内收集壁颗粒细胞块, 操作液洗涤后备用.

(4) 小的有腔卵泡颗粒细胞. 用锋利的剪刀剪碎卵巢, 在解剖镜下收集直径小于 1 mm 的卵泡, 将其刺破, 收集其中的颗粒细胞, 用口吸管清洗几遍.

(5) 卵泡液. 用注射器从卵巢表面抽取直径 3 ~ 6 mm 卵泡中的卵泡液, 4℃, 1500 × *g* 离心 10 min 后用 0.22 μm 微孔滤膜滤过除菌, -20℃保存.

(iv) 条件培养基的制备. 卵母细胞和空透明带按每微升 1 个, 颗粒细胞按每微升 1000 个的比例在加或不加促性腺激素的 50 μL 培养基中培养 24 h. 然后滤除其中的卵泡成分, 制备条件培养基.

(v) 小鼠 OOX 的培养. 将 10 ~ 15 个小鼠 OOX 放在 50 μL 条件化培养基内, 个别实验根据要求在不加激素的条件培养基内添加 PMSG 和 hCG(10 IU/mL); 检测卵泡液内 CEEF 时, 小鼠 OOX 分别培养在含有 10%和 50%的卵泡液、含或不含激素的培养基中. 培养 18 h 后检查卵丘扩展情况.

(vi) 卵丘扩展的分级. 根据扩展程度将小鼠 OOX 分为 0 ~ 4 级. 0 级: 没有扩展; 1 级: 最外层的 1 ~ 2 层卵丘细胞有扩展; 2 级: 外面的几层细胞开始呈放射状扩展; 3 级: 内层的卵丘细胞也已经扩展, 只有放射冠部分未扩展; 4 级: 包括放射冠在内的全部卵丘细胞都扩展, 而且外周部分细胞已开始脱落. 本实验中, 只有卵丘扩展到 3 级以上时才记录为扩展.

(vii) 数据统计. 各组实验均重复 3 次. 采用百分比 *t* 检验对数据进行统计分析.

2 结果

2.1 以空透明带作为条件化成分时小鼠 OOX 的扩展

为了证明猪透明带是否含有使小鼠 OOX 扩展的成分, 将小鼠 OOX 移入经猪或小鼠的空透明带条件化的培养基中培养, 结果表明小鼠 OOX 的卵丘没有发生扩展(表 1).

表 1 用小鼠或猪空透明带条件化的 TCM199 在含或不含促性腺激素条件下培养小鼠 OOX 的扩展情况

培养基条件化成分	促性腺激素 ^{a)}	OOX 数	扩展 OOX 数(%)
猪空透明带	不含	31	0
	含	30	0
小鼠空透明带	不含	32	0
	含	31	0

a) 指 PMSG 和 hCG, 以下相同

2.2 猪卵母细胞的 CEEF 分泌情况

用 A, B 和 C 类卵条件化的培养基培养小鼠 OOX 时, 不添加促性腺激素, 不发生扩展; 如添加激素, 则小鼠 OOX 发生扩展, 扩展率分别为 80%, 85.3%和 87.5%, 三组间差异不显著(表 2). 说明: (1) 猪未成熟卵母细胞分泌了 CEEF; (2) 不同类型的未成熟卵母细胞分泌 CEEF 的能力和所分泌 CEEF 的活性没有明显的差异; (3) CEEF 需要与激素共同作用, 才能使小鼠的 OOX 发生扩展.

表 2 用猪生发泡期裸卵条件化的 TCM199 在含或不含促性腺激素条件下培养小鼠 OOX 的扩展情况

条件化用卵母细胞	促性腺激素	小鼠 OOX 数	扩展 OOX 数(%)
A	不含	30	0
	含	30	24 (80%) ^{a)}
B	不含	28	0
	含	34	29 (85.3%) ^{a)}
C	不含	27	0
	含	32	28 (87.5%) ^{a)}

a) 上角标中含有相同字母者差异不显著(*P* > 0.05)

2.3 猪卵丘和卵泡颗粒细胞的 CEEF 分泌情况

在制备条件化培养液时, 无论是否有促性腺激素存在, 猪 OOX 都能产生 CEEF. 用该条件培养液添加促性腺激素培养的小鼠 OOX 都发生扩展. 小卵泡颗粒细胞的 CEEF 分泌情况与 OOX 相似. 用壁颗粒细胞进行培养基条件化时, 添加或不添加促性腺激素, 都无 CEEF 分泌(表 3).

2.4 卵泡液内的 CEEF

把小鼠 OOX 分别放在含有 10%和 50%猪卵泡液的培养基中培养发现, 从 3 ~ 6 mm 卵泡收集的卵泡液在浓度为 10%时能使 60%的小鼠 OOX 发生扩展, 但当浓度为 50%时, 小鼠 OOX 扩展率仅为 9.1%. 培养时若没有激素, 小鼠 OOX 不发生扩展(表 4).

表 3 用猪卵丘和卵泡颗粒细胞条件化的 TCM199 在含或不含促性腺激素条件下培养小鼠 OOX 的扩展情况

条件化成分	条件化时 激素有无	培养时 激素有无	小鼠 OOX 数	扩展 OOX 数(%)
猪 OOX	无	无	32	0
	无	有	39	33 (84.6%)
	有	有	30	30 (100%)
有腔小卵泡颗粒细胞	无	无	28	0
	无	有	36	32 (88.89%)
	有	有	30	30 (100%)
壁颗粒细胞	无	无	30	0
	无	有	25	0
	有	有	28	0

表 4 在含不同浓度卵泡液的 TCM199 培养基中, 加或不加促性腺激素培养小鼠 OOX 的扩展情况

卵泡液比例	培养时激素的有无	OOX 数	扩展 OOX 数(%)
10%	无	35	0
	有	30	18 (60%)
50%	无	32	0
	有	33	3 (9.1%)

3 讨论

有研究发现, 猪^[5]和牛^[4]的卵母细胞能分泌 CEEF, 它们在 FSH 存在时能使去除小鼠卵母细胞的卵丘-卵母细胞复合体扩展. 我们的研究结果除证实了这一现象外, 还证明, A, B 和 C 三类卵都能分泌 CEEF, 而且不同质量卵母细胞分泌 CEEF 能力和所分泌 CEEF 的活性没有明显差异.

对小鼠的研究表明, 睾丸支持细胞和卵泡颗粒细胞都不能产生 CEEF^[1]. 我们的研究证明, 猪小的有腔卵泡颗粒细胞和 3~6 mm 卵泡卵丘细胞都具有较强的 CEEF 分泌能力, 且此能力不依赖于激素的作用, 而 3~6 mm 卵泡的壁颗粒细胞无论是否有激素的作用, 均不能分泌 CEEF. 上述结果与 Prochazka 等人^[8]的报道结果类似, 但他们发现, 3~5 mm 卵泡壁颗粒细胞在 FSH 的作用下能分泌 CEEF, 尽管活性并不很强^[8]. 众所周知, 在卵泡腔形成后, 颗粒细胞分化为两部分: 卵丘细胞和壁颗粒细胞. 从我们的结果和 Prochazka 等人^[8]的结果可以看出, 出腔前卵泡和小的有腔卵泡内的颗粒细胞都有很强的 CEEF 分泌能力, 但随着颗粒细胞的分化, 壁颗粒细胞失去或降低了 CEEF 的分泌能力, 而卵丘细胞却仍然保持着很强的 CEEF 分泌能力.

本研究还证明, 猪 3~6 mm 卵泡的卵泡液中有 CEEF 活性. 当在培养液中添加 10%卵泡液时, 有 60%的小鼠 OOX 发生扩展, 但如果在培养液中加入 50%的卵泡液, 则只有 9%的小鼠 OOX 发生扩展. Prochazka 等人^[8]在培养液中添加 50%猪卵泡液发现, 只有 15.6%的小鼠 OOX 发生扩展. Ferdinand 等人^[9]的研究表明, 在卵泡液内同时存在 CEEF 和卵丘扩展抑制因子. 据此我们推测, 卵丘扩展抑制因子很可能要在很高浓度时才起作用, 降低卵泡液含量也就降低了它的抑制作用, 从而使 CEEF 更好地发挥了作用.

致谢 本工作为国家重点基础研究发展规划(批准号: G200016107)和国家自然科学基金(批准号: 30070556)资助项目.

参 考 文 献

1 Buccione R, Vanderhyden B C, Caron P J, et al. FSH-induced expansion of the mouse cumulus oophorus *in vitro* is dependent upon a specific factor(s) secreted by the oocyte. *Dev Biol*, 1990, 138: 16~25

2 Salustri A, Yanagishita M, Hascall V C. Mouse oocytes regulate hyaluronic acid synthesis and mucification by FSH-stimulated cumulus cells. *Dev Biol*, 1990, 138: 26~32

3 Nagyova E, Prochazka R, Motlik J. Porcine oocytes produce CEEF only during their growth period and transition to metaphase I. *Theriogenology*, 1997, 47: 197

4 Ralph J H, Tefler E E, Wilmut I. Bovine cumulus cell expansion does not depend on the presence of an oocyte factor. *Mol Reprod Dev*, 1995, 42: 24~25

5 Singh B, Zhang X, Armstrong D T. Porcine oocytes release cumulus expansion-enabling activity even though porcine expansion *in vitro* is independent on the oocyte. *Endocrinology*, 1993, 132: 1860~1862

6 Vanderhyden B C. Species differences in the regulation of cumulus expansion by an oocyte-secreted factor(s). *J Reprod Fertil*, 1993, 98: 219~227

7 孙兴参, 岳奎忠, 马所峰, 等. 猪卵丘扩展与卵母细胞核成熟关系的研究. *中国农业科学*, 2002, 35: 85~88

8 Prochazka R, Nagyova E, Brem G, et al. Secretion of cumulus expansion-enabling factor (CEEF) in porcine follicles. *Mol Reprod Dev*, 1998, 49: 141~149

9 Ferdinand P D, Kazuchika M, Eimmei S. Factors in porcine follicular fluid arresting the induction of cumulus expansion of oocyte-cumulus complexes cultured *in vitro*. *J Reprod Dev*, 1997, 43: 165~170

(2002-04-22 收稿, 2002-06-04 收修改稿)