

小鼠输卵管卵母细胞的形态学研究¹⁾

钱菊汾 王建辰 刘 灵²⁾ 康竹梅²⁾

(西北农业大学兽医系, 陕西杨陵)

姚亚琴 蒋选利

(西北农业大学中心实验室, 陕西杨陵)

摘 要 应用光、电镜技术研究发现: 新排卵母细胞的纺锤体位于动物极质膜下, 长轴与质膜平行, 卵周隙狭窄, 除纺锤体区外, 微绒毛呈倒伏状遍布于卵细胞表面, 皮质颗粒排列于质膜下, 线粒体多分布于卵母细胞近中区及染色体旁, 排卵后2~4 h, 纺锤体在质膜下旋转90°, 卵周隙增宽, 微绒毛逐渐竖起, 少数皮质颗粒提前外排, 线粒体趋于分散; 排卵后8 h, 纺锤体内移, 微绒毛趋于融合, 皮质颗粒减少, 线粒体退化。

关键词 卵体外受精, 形态学, 实验动物/小鼠, 卵母细胞成熟

中图分类号 S814.6, S865.130.3

1951年张明觉和Austin分别发现的精子获能现象对体外受精的研究具有划时代的重要意义。截至目前, 虽经体外受精获得的哺乳动物已有10余种, 而得到“试管”后代数量较少, 且种间差异大。其原因可能与卵母细胞在受精前未能得到充分成熟有关, 或者说卵母细胞象精子一样可能也存在一个“获能”过程, 值得探讨。

关于卵母细胞发育成熟的形态学研究, 以往主要是描述在卵巢内的变化^[1-3], 在输卵管内的变化, 报道较少, 且多研究的是卵子老化过程^[4-6]。Fraser曾提出, 在输卵管内停留一定时间的小鼠卵母细胞, 其受精、原核形成、卵裂和以后的发育速度均比刚排出的卵母细胞快^[7]。谭景和在研究小鼠卵母细胞酒精孤雌活化时也发现, 只有在输卵管内停留6 h的卵子, 其活化率最高^[8]。这些结果表明, 小鼠卵子从卵巢排出进入输卵管后数小时内, 还在经历一个充分成熟的过程, 卵子只有达到充分成熟的阶段, 才能发生快速正常的受精、卵裂以至胚胎进一步的发育。

排卵后卵母细胞充分成熟的超微结构变化, 目前尚没有完整的资料。本研究的目的在于揭示卵母细胞及其外被结构在充分成熟时的形态学标志, 为体外受精提供理论和实践依据。

1 材料与方 法

试验动物 昆白小鼠48只, 雌性, 体重20~22 g, 健康, 由第四军医大学动物中心提供。

文稿收稿日期: 1990-06-27。

1) 高等学校博士点基金资助项目。

2) 89届本科毕业生。

试剂 PMSG (长春生物制品研究所, 批号871-1), LH (宁波市激素制品厂, 批号890304), 透明质酸酶 (Sigma, 批号115F-8165), 链霉蛋白酶 (Merck, 批号143008)。

超排 每只小鼠腹腔注射10 iu PMSG, 48 h后, 腹腔注射5 iu LH。注入LH后分别于12, 14, 15, 16, 20, 24 h回收输卵管卵丘-卵母细胞复合体。

扫描电镜(SEM)样本制作 将形态正常的卵丘-卵母细胞复合体, 用0.1%透明质酸酶脱去卵丘细胞, 其中部分再以0.5%链霉蛋白酶去掉透明带, 3%戊二醛固定, 粘于涂有3%聚乙烯醇缩甲酸的滤纸片上, 1%锇酸后固定, 乙醇逐级脱水, 乙酸异戊脂置换。CO₂临界点干燥。镀膜后, S₄₅₀型SEM观察。

透射电镜(TEM)样本制作 卵丘-卵母细胞固定后, Epon 812包埋, LKB 11800型半薄切片机切成1 μm厚片(部分厚片美兰染色, 光镜观察), 光镜下定位, LKB 480型超薄切片机切成700~800 Å薄片, 醋酸双氧铀和枸橼酸铅双染色, DXB₂-12型TEM观察。

2 结果

2.1 排卵“0”点

小鼠于注LH后12 h排卵数最多, 平均每只鼠排卵22.8枚, 个别鼠于注LH后11.5 h排出几枚卵(表1)。由此确定注LH后12 h为排卵“0”点。

2.2 注入LH后12 h的卵母细胞(排卵0时)

从图1可见卵丘细胞形似一个球壳包围着卵母细胞, 但卵丘细胞突起均已与透明带脱离; 透明带结构完整, 卵周隙宽约0.8 μm; 卵质膜下可见第二次减数分裂中期(M II)纺锤体, 其长轴与质膜平行。

电镜下, 透明带表面呈有孔的海绵样结构; 卵周隙内充有稀疏粗短的微绒毛倒伏于卵表面(图2); 卵母细胞动物极质膜下有M II的染色体, 染色体区质膜光滑, 无微绒毛, 质膜下亦无皮质颗粒; 其余质膜下可见分布不均单行排列的皮质颗粒(图3), 皮质颗粒呈圆形或卵圆形, 直径0.2~0.4 μm, 电子密度高; 线粒体三五成群, 主要分布于细胞近中区及染色体周围, 呈圆形或卵圆形, 一端膜下有一空泡, 另一端有密集的弧形嵴, 称泡状线粒体; 胞质中含有丰富的卵黄板和卵黄泡(图2~4), 前者为板层状排列却具有周期性横纹的结构, 后者呈泡状, 内含絮状物, 泡膜外附着许多核糖体颗粒, 有些卵黄泡有缺口, 其内容物与胞质相通; 皮质区内可见大的高尔基复合体, 呈多泡体结构(图2)。

2.3 注入LH后14~16 h的卵母细胞(排卵后2~4 h)

与前者相比, 有如下特征: 卵周隙增宽约1倍, 达1.6~1.7 μm; 微绒毛逐渐竖起, 变得细长, 伸入卵周隙中, 于排卵后1 h竖得最高(图4); 部分皮质颗粒内容物提前外排; 线粒体趋于分散; 排卵后2 h纺锤体开始旋转, 至4 h, 纺锤体长轴与质膜呈垂直状(图5)。

表1 注射LH后不同时间小鼠排卵数

LH后时间 (h)	小鼠数 (只)	排卵数 (枚)	平均排卵数 (枚)
10	4	0	0
11	4	0	0
11.5	4	3	0.75
12	4	91	22.8

2.4 注入LH后20~24 h的卵母细胞(排卵后8~12 h)

该时期卵母细胞呈退化迹象,其特征是:微绒毛趋于融合,变得粗短,呈伪足状突起;质膜下皮质颗粒数量大减;线粒体退化,嗜不清或脱落呈鸡眼样;大量卵黄泡膨胀,局部膜破裂,内容物减少,有的卵黄泡内出现浓缩的致密球状颗粒(图6);M_I纺锤体逐渐远离质膜而向细胞内部迁移(图7)。

3 讨 论

3.1 关于纺锤体

Szollosi 报道,小鼠排卵后5~12 h卵母细胞M_I纺锤体位于质膜下,其长轴平行于质膜,12 h后旋转90°,继而内移至卵中央^[4]。本试验中发现,排卵后2 h纺锤体开始旋转,至4 h旋转90°,8 h已开始内移。根据这一规律,我们认为,纺锤体旋转90°有利于受精后第二极体的排出,因为细胞分裂末期,胞质溢裂总是垂直于纺锤体长轴。据此认为,小鼠卵母细胞核最后成熟是排卵后4 h。如卵子不受精,纺锤体内移,这是卵子老化的标志,与谭景和在猪和山羊上的观察结果相类似^[6,8]。

3.2 关于微绒毛

现已证明微绒毛在精、卵接触、融合过程中起着重要作用。谭景和对山羊卵子的研究中提出,只有微绒毛竖起时才能发挥其减少卵母细胞表面负电荷和促进精卵融合的作用,而微绒毛融合则标志着卵子退化^[9]。本试验中,排卵后2~4 h,微绒毛由倒伏逐渐竖起,变得细长,4 h竖得最高,8~12 h趋于融合,呈伪足状突起。可见小鼠卵母细胞质膜的最后成熟是排卵后4 h,8 h卵母细胞已老化。

3.3 关于皮质颗粒

许多学者研究证明,皮质颗粒内容物在受精时外排到卵周隙中,改变透明带结构,阻止多精子入卵^[11,12]。近来,又观察到卵细胞在受精前有提前释放一定数量皮质颗粒的现象,推测:(1)有助于卵周隙的扩大和微绒毛的竖起,使穿入卵周隙的精子赤道段质膜易与微绒毛质膜相融合;(2)提前外排的皮质颗粒内容物可能先作用于透明带,使之变得不易穿透,只有活力极强的精子才能穿透,以保证优质精子的受精^[12]。本试验同样发现排卵后2~4 h卵母细胞,有少量皮质颗粒内容物外排,这时的卵周隙明显增宽,微绒毛逐渐竖起。因而,笔者认为皮质颗粒提前外排,可能也是卵母细胞充分成熟的标志之一。

3.4 关于线粒体

本试验中,线粒体内有一泡状结构,与前人实验观察相一致^[13]。随着卵母细胞的充分成熟,线粒体由集中趋于分散;卵母细胞老化时又有集中的趋势,这与谭景和在山羊卵母细胞中观察的相类似^[8]。而且成熟卵母细胞的线粒体往往与M_I染色体相伴随,可能与受精时抛出第二极体需要能量有关。

3.5 关于卵黄物质

广义上讲,卵黄物质是指所有卵内贮存的营养物质,其中包括脂滴和糖元颗粒在内;在狭义上,卵黄物质指蛋白和脂类的小板和小块^[14]。现已查明,仓鼠^[10]、兔^[11]、狗^[15]、绵羊^[2]、山羊^[8]和人^[16]等卵子内的卵黄物质是以卵黄泡和卵黄板

的形式存在。猪^[17]、山羊^[8]和牛^[18]的卵子内还含有大量脂滴。本试验表明,小鼠卵母细胞内的卵黄物质主要是卵黄泡和卵黄板,脂滴极少。排卵后0~4 h的卵母细胞,有少量卵黄泡出现小缺口,其内容物与胞质相通,可能这是卵母细胞为维持这一时期低水平代谢而利用其自身营养物质的一种方式;卵黄板则无变化,甚至在排卵后8~12 h的退化卵中,仍保持其基本形态,这与谭景和在山羊上的研究结果相一致^[9]。可能小鼠的卵黄板是卵子受精后发育必不可少的卵黄物质。有人发现,仓鼠的卵黄板在受精后数量减少,直至囊胚后期才全部消失^[18]。

综上所述,小鼠排卵后卵母细胞尚在进行核、质、膜的进一步成熟,有着明显的形态学变化,这些变化有利于正常受精的发生。因此,卵母细胞从卵巢排出后,与射出精子一样,也经历一个“获能”过程。小鼠卵母细胞的获能时间约4 h。

参 考 文 献

- 1 Zamboni L. Electron microscopic studies on rabbit ova, I. The follicular oocyte. *J Ultrastruct Res*, 1966, 14: 95~117
- 2 Cran D G. Pine structure of the sheep oocyte during antral follicle development. *J Reprod Fert*, 1980, 59: 125~132
- 3 Kruip T A M. Structural changes in bovine oocyte during final maturation in vivo. *Gamete Res*, 1983, 8: 29~48
- 4 Szollosi D. Morphological changes in mouse eggs due to aging in the fallopian tube. *Am J Anat*, 1971, 130: 209~226
- 5 Longo F J. Aging of mouse egg in vivo and in vitro. *Gamete Res*, 1980, 3: 379~393
- 6 谭景和. 猪排卵后卵母细胞老化过程的超微结构研究. *畜牧兽医学报*, 1985, 16 (1), 1~10
- 7 Fraser L R. Rate of fertilization in vitro and subsequent nuclear development as a function of the post-ovulatory age of the mouse egg. *J Reprod Fert*, 1979, 55: 153~160
- 8 谭景和. 卵龄和培养液中青霉素浓度对小鼠卵母细胞酒精孤雌活化效果的影响. *细胞生物学杂志*, 1988, 10 (2): 69~71
- 9 谭景和. 山羊卵子的研究. 东北农学院博士论文, 1988: 122~124, 128~131
- 10 Hadek R. *Mammalian Fertilization, An Atlas of Ultrastructure*. New York: Academic Press, 1969
- 11 Szollosi D. Development of cortical granules and the cortical reaction in rat and hamster egg. *Anat Res*, 1967, 159: 431~446
- 12 Nicosia S V. Cortical granule distribution and cell surface characteristics in mouse eggs. *Devel Biol*, 1977, 57: 36~74
- 13 Yamada E T. The fine structure of the oocyte in the mouse ovary studied with electron microscope. *Kurume Med J*, 1957, 4: 148~160
- 14 Waddington C H. *Principles of Embryology*. London: George Allen, 1962. 36
- 15 Tesoriero J V. Early ultrastructural changes of developing oocytes in the dog. *J Morph*, 1981, 168: 171~179
- 16 刘斌. 国人卵母细胞的形态结构. *解剖学报*, 1986, 17 (3): 288~291
- 17 李云龙. 猪卵巢内卵母细胞发育的超微结构研究. *东北农学院学报*, 1983 (1), 69~83
- 18 Enders A C. *In preimplantation stages of pregnancy*. London: Churchill, 1965. 29

Morphological Studies on the Mouse Oviductal Oocyte

Qian Jufen Wang Jianchen Liu Ling Kang Zhumei

(Department of Veterinary Medicine, Northwest Agricultural University, Yangling, Shaanxi)

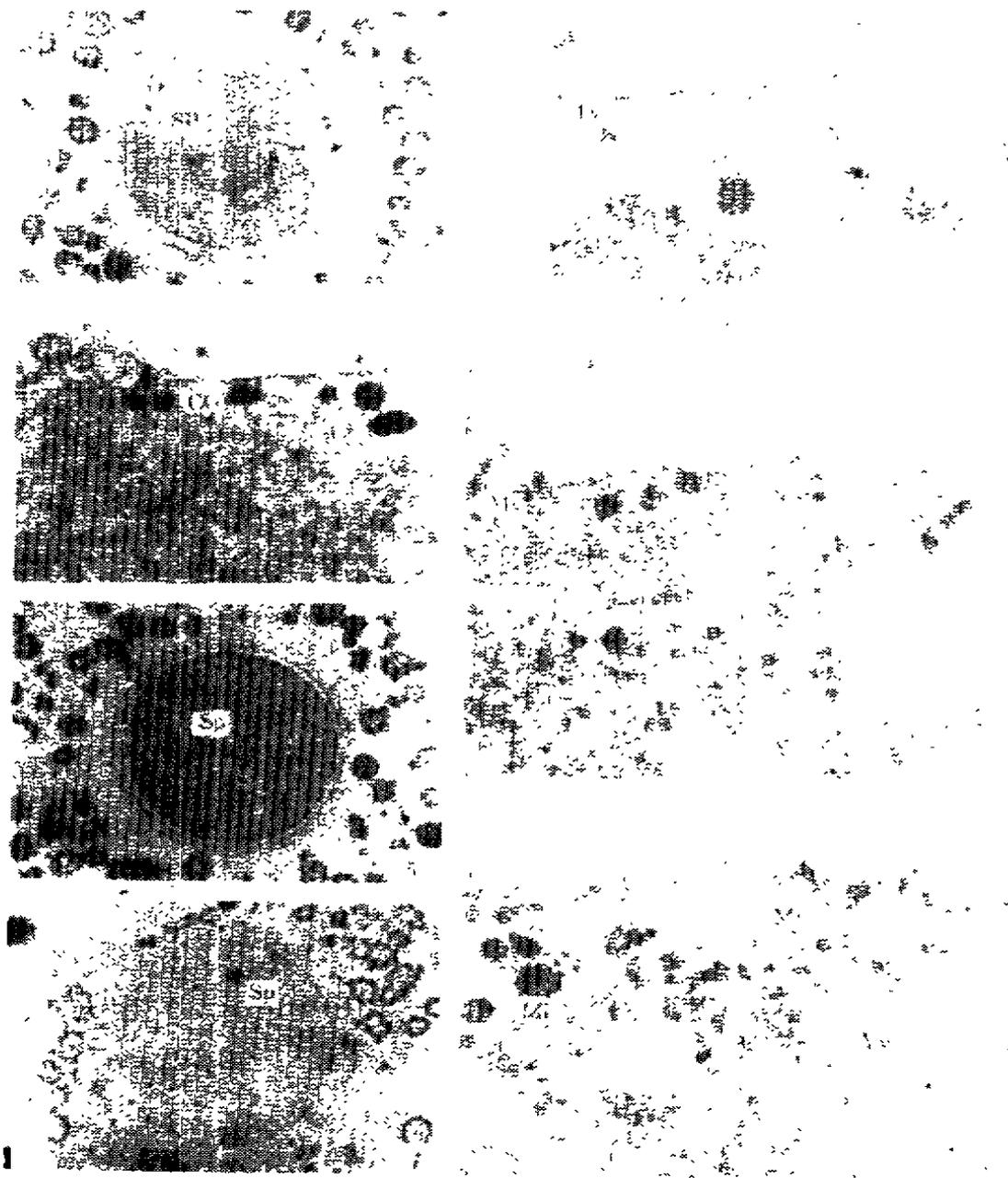
Yao Yaqin Jiang Xuanli

(Central Laboratory, Northwest Agricultural University, Yangling, Shaanxi)

Abstract The main findings with the techniques of light and electron microscopes (SEM and TEM) were shown as follows: the spindle of freshly ovulated oocytes is located under the animal pole cytoplasmic membrane, and its axis is oriented parallel to the egg plasma membrane. Microvilli lay over the entire egg surface with the exception of the region overlaying the spindle. The perivitelline space is narrow. Simple layer cortical granules distribute irregularly throughout the peripheral zone of the oocyte with the exception of the region overlaying the spindle. Vesicular mitochondria are mainly located at the central area of the oocyte and at the side of chromosomes. The metaphase II spindle rotates 90° under the egg plasma membrane 2-4 hours after ovulation. Perivitelline space becomes wide. Microvilli set upright and become long and thin. Few cortical granules release their contents to the perivitelline space in advance. Mitochondria tend to disperse. The spindle migrates inward 8 hours after ovulation. Microvilli tend to mix and become wide. The number of cortical granules reduces, and mitochondria degenerate.

Key words eggs, external fertilization, morphology, laboratory animal/
mouse, oocyte maturation

钱菊汾等：小鼠输卵管卵母细胞的形态研究



1~3. 注入LH后12 h的卵母细胞；4~5. 注入LH后15 h的卵母细胞；6~7. 注入LH后24 h的卵母细胞
Sp. MII 纺锤体；Mv. 微绒毛；Go. 高尔基复合体；Mi. 线粒体；CG. 皮质颗粒；Yv. 卵黄泡；
Yp. 卵黄板