

磷酸二酯酶抑制剂对山羊卵母细胞 体外成熟及孤雌胚发育的影响

马利兵, 华松, 曹俊伟, 杨丽, 张涌

(西北农林科技大学 生物工程研究所, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 哺乳动物有腔卵泡中的卵母细胞在体外会自发恢复减数分裂, 适当延迟减数分裂的自发恢复, 能促进核与胞质成熟的同步化, 有利于后续胚胎的发育。本试验研究了磷酸二酯酶3 (PDE 3) 特异性抑制剂milrinone对山羊卵母细胞体外成熟及孤雌胚发育的影响。结果表明, milrinone抑制山羊卵母细胞体外成熟的时间为6 h, 其最佳剂量为100 $\mu\text{mol/L}$, 经milrinone处理体外培养28 h成熟的山羊卵母细胞用于孤雌激活, 能显著提高孤雌激活胚的卵裂率及囊胚率。说明成熟培养液中添加适当剂量的milrinone, 能显著提高体外成熟的山羊卵母细胞的质量。

[关键词] 磷酸二酯酶抑制剂; 卵母细胞; 体外成熟; 山羊

[中图分类号] Q 813.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)02-0006-05

The effects of phosphodiesterase inhibitors on maturation and parthenogenesis of goat oocytes in vitro

MA Libing, HUA Song, CAO Junwei, YANG Li, ZHANG Yong

(Institute of Biological Engineering, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The oocytes of antral follicles can spontaneously resume meiosis *in vitro* in mammalian, properly delay the process of spontaneous meiotic maturation *in vitro* may promote the homochronous maturation of nucleus and ooplasm and benefit the following embryo's development. The experiment researches the effects of phosphodiesterase type 3 (PDE 3) inhibitors milrinone on maturation and parthenogenesis of goat oocytes *in vitro*. The results show that the time of the PDE 3 inhibitor delaying the goat oocyte mature *in vitro* is 6 hours, the best dosage is 100 $\mu\text{mol/L}$. After parthenogenetic activation, the goat oocytes after 28 hour matured culture in PDE 3 inhibitor-supplemented media have both higher cleavage rate and blastocyst rate. Therefore, milrinone-supplemented media can significantly enhance the quality of goat oocyte matured *in vitro*.

Key words: phosphodiesterase inhibitor; oocyte; maturation *in vitro*; goat

哺乳动物的雌性胎儿在出生前后就形成了一定数量的卵母细胞, 此时的卵母细胞均保持在第一次减数分裂的双线期, 直至达到性成熟后在促性腺激素的作用下发育成熟、排卵或闭锁退化。体内非闭锁的有腔卵泡中的卵母细胞仍处于非成熟的生发泡

(geminal vesicle, GV)阶段, 经体外培养会自发恢复减数分裂, 经历生发泡破裂 (geminal vesicle breakdown, GVBD), 排出第一极体, 进入M II期, 从而成熟。但体外成熟的卵母细胞与体内成熟的卵母细胞所形成的胚胎在早期发育方面, 前者较后者

· [收稿日期] 2006-01-06

[基金项目] 国家“863”计划项目(2001AA 213081)

[作者简介] 马利兵(1973-), 男, 内蒙古包头人, 在读博士, 主要从事哺乳动物胚胎工程研究。

[通讯作者] 张涌(1956-), 男, 内蒙古和林格尔人, 教授, 博士生导师, 主要从事哺乳动物胚胎工程及发育生物学研究。

差^[1]。其原因可能是体外培养的卵母细胞核成熟与胞质成熟不同步,即在卵胞质积累必要的因子达到完全成熟之前核已经成熟^[2]。而在目前的体外受精及核移植试验中,大多使用体外成熟的卵母细胞。因此适当延迟体外培养过程中核的自发成熟,使核与胞质的成熟同步化将有利于核移植及体外受精胚的发育。

第二信使cAMP在哺乳动物特别是啮齿类动物卵母细胞的成熟过程中有重要的作用^[3]。磷酸二酯酶3(phosphodiesterase, PDE 3)特异性抑制剂米力农(milrinone)能阻止cAMP的降解,用其处理牛、小鼠、短尾猿及人的卵母细胞,结果均导致胞质内cAMP的积聚^[2, 4-6],卵母细胞减数分裂的自发恢复受阻,延迟了卵母细胞的核成熟,从而有利于核质成熟的同步化。经此处理的体外成熟小鼠、牛卵母细胞用于体外受精时,可显著提高受精率、胚胎的发育能力及胎儿的出生率^[2, 7]。

有关米力农对山羊卵母细胞体外成熟影响的研究还未见报道。为了探讨米力农在山羊卵母细胞体外成熟过程中的作用及其对孤雌激活胚体外发育的影响,建立一套更为完善的山羊卵母细胞体外成熟体系,本试验研究了米力农对山羊卵母细胞体外成熟及孤雌胚发育的影响,以进一步提高山羊体外受精及核移植的成功率。

1 材料与方法

1.1 试剂

试验所用试剂除非特别说明,均购置于Sigma公司。试剂主要有离子霉素,6-DMAP,肝素钠,milrinone,透明质酸酶和石蜡油。成熟培养液为TCM-199(Gibco公司生产)添加10 mmol/L Hepes,0.38 mmol/L 丙酮酸钠,50 μ g/mL 硫酸庆大霉素,体积分数10% FBS(Hyclone公司生产),1 μ g/mL 17β E₂,0.075 IU/mL FSH & LH(HMG, Serono公司生产),10 ng/mL EGF(Gibco公司生产)。胚胎培养液为添加体积分数10% FBS的SOFaa胚胎培养液,即107.70 mmol/L NaCl,17.61 mmol/L KCl,1.19 mmol/L KH₂PO₄,1.71 mmol/L CaCl₂·2H₂O,0.49 mmol/L MgCl₂·6H₂O,25.07 mmol/L NaHCO₃,0.30 mmol/L 丙酮酸钠,3.30 mmol/L 乳酸钠,体积分数2%必需氨基酸(Gibco公司生产),体积分数1%非必需氨基酸(Gibco公司生产),1 mmol/L 谷氨酰胺,8 g/L BSA,50 μ g/mL 硫酸庆大霉素。

1.2 山羊卵母细胞的采集

从屠宰场收集山羊卵巢,置于20~30℃、含0.32 g/L 硫酸庆大霉素的生理盐水中,在6~8 h内带回实验室,于添加体积分数5% FBS、0.054 g/L 肝素钠的PBS液中用手术刀片切开卵巢表面直径1~5 mm大小的卵泡,收集山羊卵巢卵丘-卵母细胞复合体(COCs)。

1.3 山羊卵母细胞的体外成熟培养及米力农最佳使用剂量的确定

随机选取约20个具有多层卵丘细胞包裹的COCs,置于1个50 μ L 上覆石蜡油的成熟培养液微滴中,在38.5℃、体积分数5% CO₂、饱和湿度条件下进行培养。制备7个微滴,向其中6个微滴中分别添加40,60,80,100,120,140 μ mol/L 米力农,另一微滴作为空白对照,用于COCs成熟培养,重复6次。分别在成熟培养3,5,7,9,11,13 h取一组重复,将微滴中的COCs移入含2 g/L 透明质酸酶的PBS液中,作用3~5 min,同时反复吹吸,脱去卵丘细胞,收集卵母细胞于PBS液中。在实体显微镜下,以第一极体的排出为标准,观察并计算各微滴中发生及未发生GVBD的卵母细胞比例,每一时间点重复3次,取其平均值。

1.4 米力农对山羊卵母细胞成熟抑制作用时间的确定

向10个50 μ L 上覆石蜡油的成熟培养液微滴中,分别移入随机选取的约20个具有多层卵丘细胞包裹的COCs,其中5个微滴中含100 μ mol/L 的米力农,其余的5个微滴作为空白对照组。分别于体外培养10,16,22,28,34 h取试验组及对照组各1个微滴,观察并计算其中成熟卵母细胞的比例,重复3次,取其平均值。成熟培养液及卵母细胞成熟的判断方法同上。

1.5 米力农对山羊孤雌胚发育的影响

采用添加100 μ mol/L 米力农的成熟培养液体外培养28 h及未添加米力农的成熟培养液体外培养22 h的COCs用于孤雌激活。COCs经脱卵丘细胞处理,用5 μ mol/L 离子霉素激活5 min后,迅速放入含5 mmol/L 6-DMAP的培养液中培养4 h,然后置于胚胎培养液中于38.5℃、体积分数5% CO₂及饱和湿度条件下进行培养,每24 h半量换液。分别于培养24 h~38 h及5~7 d时观察,并计算孤雌胚的卵裂率及囊胚率。

1.6 数据处理

利用t-检验及方差分析对数据作统计学分析。

2 结果与分析

2.1 米力农最佳使用剂量

由图1可知,随着成熟液中米力农添加剂量的增加,其对山羊卵母细胞成熟的抑制作用增强;与对照组相比,添加40 μmol/L 的米力农对山羊卵母细胞体外成熟只有轻微的抑制作用,体外培养9 h,有23%的卵母细胞发生了GVBD;11 h时,有34%的卵母细胞发生了GVBD。当米力农的剂量增加到60和80 μmol/L,9 h时分别有19%和5%发生了GVBD。但当米力农的剂量增加到100 μmol/L,体外培养11 h时,100%的卵母细胞未发生GVBD。米力农剂量继续增加(120, 140 μmol/L),其对山羊卵母细胞的抑制作用没有变化。体外培养13 h时,100, 120和140 μmol/L 组均有部分卵母细胞发生了GVBD,且彼此之间差异不明显($P > 0.05$)。因此米力农的最

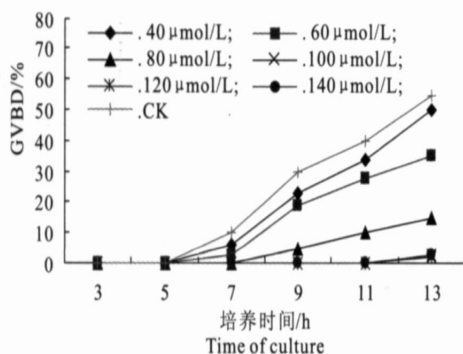


图1 不同剂量米力农对山羊卵母细胞体外成熟的影响

Fig 1 Effect of PDE3 inhibitor dosages on goat oocytes maturation in vitro

2.3 米力农对孤雌胚发育的影响

由表1可知,米力农处理组的卵裂率显著高于

表1 米力农对山羊卵母细胞孤雌激活及孤雌胚发育的影响

Table 1 Effect of PDE 3 inhibitor on parthenogenetic activation and embryos development of goat oocytes

组别 Group	处理卵母细胞数 No. of oocytes treated	卵裂率/% Cleaved rate	囊胚率/% Blastocyst rate
对照组 CK	42	78.6(33/42) a	42.9(18/42) A
米力农组 Milrinone	48	85.4(41/48) b	62.5(30/48) B

注:表中同列数据后标不同小写英文字母表示差异显著($P < 0.05$);标不同的大写字母表示差异极显著($P < 0.01$)。

Note: The different small letters in the same column indicate significance at 0.05 level; the different capital letters in the same column indicate significance at 0.01 level

3 讨论

目前,体外受精及核移植研究所用的卵母细胞大多为体外培养成熟,且均以核的成熟情况判断卵母细胞的成熟,即以卵母细胞发生GVBD 排出第一

佳使用剂量为100 μmol/L。

2.2 米力农对山羊卵母细胞体外成熟抑制作用的持续时间

从图2可以看出,随着培养时间的延长,米力农对山羊卵母细胞成熟的抑制作用逐渐减弱。体外培养10 h,米力农处理组100%的卵母细胞未发生GVBD。但培养时间延长到16 h时,米力农处理组已有20%的卵母细胞发生了GVBD。培养时间为22 h时,米力农处理组和对照组分别有50%和75%的卵母细胞发生了GVBD,且两组之间差异明显($P < 0.05$)。而在28 h时,米力农处理组和对照组分别有78%和75%的卵母细胞发生了GVBD,两组之间差异不明显($P > 0.05$)。对照组在22 h时,即有75%的卵母细胞达到完全成熟,而米力农处理组在28 h时才达到75%的成熟率,可见米力农对山羊卵母细胞体外成熟的抑制作用时间大约为6 h。

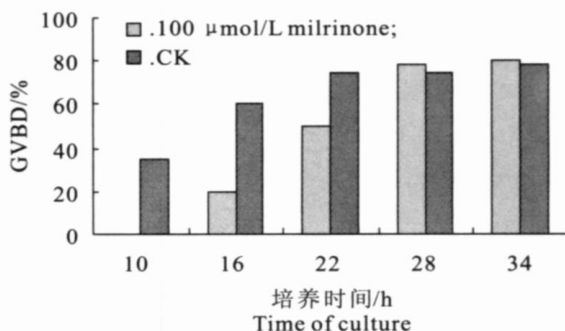


图2 米力农对山羊卵母细胞体外成熟抑制时间的影响

Fig 2 Duration of effect of PDE3 inhibitor on goat oocytes maturation in vitro

对照组($P < 0.05$),体外囊胚率极显著高于对照组($P < 0.01$)。

极体作为判断其成熟的标准。而卵母细胞核成熟与胞质成熟的非同步性,使采用上述成熟标准获得的卵母细胞可能会导致胚胎发育率及胎儿出生率较低。因此,许多学者采用多种蛋白质合成及磷酸化抑制剂(如 cycloheximide, 6-DMA P^[8])或细胞周期依

赖性蛋白激酶抑制剂(如 butyrolactone I^[9], roscovitine^[10])延迟体外培养卵母细胞核的自发成熟,以获得较高的胚胎发育率及胎儿出生率。在进行卵母细胞体外培养时,人们发现cAMP及其类似物dbcAMP,磷酸二酯酶的抑制物,腺苷酸环化酶和能激活腺苷酸环化酶的物质(如 forskolin)等,均能抑制GVBD的发生^[11]。其机理可能在于,cAMP是p34^{cdc2}激酶的翻译后调控因子,抑制了p34^{cdc2}的磷酸化。当卵母细胞内cAMP水平下降时,cAMP依赖蛋白激酶活性下降,细胞内磷酸化与去磷酸化水平发生相应的改变,激活酪氨酸磷酸酶,催化p34^{cdc2}发生去磷酸化,成为有活性的激酶,进而使RNA聚合酶II、波形蛋白(vimentin)、B1和B2核纤层蛋白(lamins)等多种蛋白质发生磷酸化,这些物质分别在转录和翻译水平上控制减数分裂周期,影响微丝的排列与重组、中间丝的组合、核的重排等,进而使卵母细胞恢复减数分裂^[12]。磷酸二酯酶抑制剂通过抑制卵胞质内cAMP的降解,从而抑制了卵母细胞减数分裂的自发恢复。与啮齿类及灵长类动物相比,有蹄类动物PDE抑制剂对卵母细胞GVBD发生的抑制作用时间较短^[13]。本试验发现,与空白组相比,成熟培养液中添加100 $\mu\text{mol/L}$ 的米力农,对山羊卵母细胞体外成熟的抑制作用时间为6 h,与PDE 3特异性抑制剂对牛卵母细胞成熟抑制作用^[2]的结果相近。与FSH结合使用,米力农可延迟牛卵母细胞GVBD发生的时间至少为4 h^[2]。而人的卵母细胞预先在米力农中处理24 h后,再进行体外成熟培养,能获得更高的胚胎发育率^[14]。卵泡包裹的小鼠卵母细胞在体外经PDE抑制剂处理12 d,并不影响后续卵母细胞的生长及成熟^[15]。

在应用米力农调节核的自发成熟时,要结合使用腺苷酸环化酶激活剂,如FSH或forskolin^[2]。因为FSH能激活卵丘细胞内的腺苷酸环化酶,使卵丘细胞内的cAMP水平上升,进而通过卵丘-卵母细胞之间的连接进入卵母细胞,导致卵母细胞内的cAMP水平上升^[16]。如果卵母细胞内没有米力农,其中的cAMP很快被PDE的降解,从而导致核恢复减数分裂。米力农对核成熟的抑制反过来会延长卵丘-卵母细胞之间的连接,从而使更多的cAMP由卵丘细胞进入卵母细胞。本试验未研究FSH与PDE 3特异性抑制剂,在抑制体外培养的山羊卵母细胞核的自发成熟中的协同或拮抗作用,但相关的一些研究表明,两者在抑制某些物种卵母细胞核的自发成熟中具有相互促进的作用^[2,16]。

不同剂量的米力农对卵母细胞成熟的抑制作用不同。本试验结果表明,随着米力农浓度的增加,其对卵母细胞成熟的抑制作用加强,但当浓度达到100 $\mu\text{mol/L}$ 时,继续增加浓度抑制作用不变,此剂量与其对牛卵母细胞抑制的最佳剂量相同^[2]。但在啮齿类及灵长类动物上,米力农的浓度较本研究结果小^[4-6]。不同物种的卵母细胞对米力农敏感性不同的原因,可能在于其卵胞质内PDE的含量不同。一旦细胞内的PDE被完全抑制,米力农浓度的继续增加,不再会起到附加的效应。

本试验结果表明,经米力农处理的山羊卵母细胞所获的胚胎体外发育率较高,这与其他研究结果相似^[2,4-6]。表明米力农处理卵母细胞,在延迟核成熟的同时,不会影响胚胎的进一步发育。

卵母细胞的质量是影响核移植及体外受精成功率的一个重要因素。本试验结果显示,向培养液中添加100 $\mu\text{mol/L}$ 的PDE 3特异性抑制剂米力农,可将成熟时间延长到28 h,从而提高体外成熟的山羊卵母细胞的质量。但经此程序成熟的山羊卵母细胞,用于核移植及体外受精时是否会提高成功率,还有待进一步的研究。

[参考文献]

- [1] Trounson A, Anderiesz C, Jones G. Maturation of human oocytes *in vitro* and their developmental competence [J]. *Reproduction*, 2001, 121: 51-75
- [2] Thomas R E, Thompson J G, Armstrong D T, et al. Effect of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors during *in vitro* maturation of bovine oocytes on meiotic and developmental capacity [J]. *Biol Reprod*, 2004, 71: 1142-1149
- [3] Conti M, Andersen C B, Richard F J, et al. Role of cyclic nucleotide phosphodiesterases in resumption of meiosis [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 1998, 145: 9-14
- [4] Gilchrist R, Ritter L, Armstrong D. Mouse oocyte mitogenic activity is developmentally coordinated throughout folliculogenesis and meiotic maturation [J]. *Dev Biol*, 2001, 240: 289-298
- [5] Jensen J T, Schwinof K M, Zelinski Wooten M B, et al. Phosphodiesterase 3 inhibitors selectively block the spontaneous resumption of meiosis by macaque oocytes *in vitro* [J]. *Hum Reprod*, 2002, 17: 2079-2084
- [6] Nogueira D, Albano C, Adriaenssens T, et al. Human oocytes reversibly arrested in prophase I by phosphodiesterase type 3 inhibitor *in vitro* [J]. *Biol Reprod*, 2003, 69: 1042-1052
- [7] Nogueira D, Cortvrindt R, De Matos D G, et al. Effect of phosphodiesterase type 3 inhibitor on developmental competence of immature mouse oocytes *in vitro* [J]. *Biol Reprod*, 2004, 71: 1142-1149

- Reprod, 2003, 69: 2045-2052
- [8] Lonergan P, Khatir H, Carolan C, et al Bovine blastocyst production *in vitro* after inhibition of oocyte meiotic resumption for 24 h[J]. J Reprod Fertil, 1997, 109: 355-365
- [9] Hashimoto S, Minami N, Takakura R, et al Bovine immature oocytes acquire developmental competence during meiotic arrest *in vitro*[J]. Biol Reprod, 2002, 66: 1696-1701
- [10] Ponderato N, Crotti G, Turini P, et al Embryonic and foetal development of bovine oocytes treated with a combination of butyrolactone I and roscovitine in an enriched medium prior to IVM and IVF[J]. Mol Reprod Dev, 2002, 62: 513-518
- [11] Eppig J J, Downs S M. Chemical signals that regulate mammalian oocyte maturation[J]. Biol Reprod, 1984, 30: 1-11
- [12] 陈大元 受精生物学-受精机制与生殖工程[M]. 北京: 科学出版社, 2000
- [13] Thomas R E, Armstrong D T, Gilchrist R B. Bovine cumulus cell-oocyte gap junctional communication during *in vitro* maturation in response to manipulation of cell-specific cyclic adenosine 3', 5' monophosphate levels [J]. Biol Reprod, 2004, 70: 548-556
- [14] Nogueira D, Ron-El R, Friedler S, et al Meiotic arrest *in vitro* by phosphodiesterase 3-inhibitor enhances maturation capacity of human oocytes and allows subsequent embryonic development[J]. Biol Reprod, 2006, 74: 177-184
- [15] Nogueira D, Cortvrindt R, Everaerd B, et al Effects of long-term *in vitro* exposure to phosphodiesterase type-3 inhibitors on follicle and oocyte development[J]. Reproduction, 2005, 130: 177-186
- [16] Thomas R E, Armstrong D T, Gilchrist R B. Differential effects of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors on bovine oocyte meiotic maturation[J]. Dev Biol, 2002: 244: 215-225

(上接第5页)

- [12] 桑润滋, 韩建永, 孙国杰, 等 山羊类ES细胞的分离与克隆[J]. 中国兽医学报, 2003, 23(4): 403-407
- [13] Amit M, Shariki C, Margulets V, et al Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells[J]. Biol Reprod, 2004, 70: 837-845
- [14] 马保华, 王光亚, 赵晓娥, 等 生产条件下安哥拉山羊胚胎徒手分割研究[J]. 中国兽医学报, 1998, 18(1): 403-407
- [15] 李明, 李永海, 张东, 等 一种简单的分离猪囊胚内细胞团的方法[J]. 农业生物技术学报, 2004, 12(3): 349-350
- [16] Rossant J, Chazaud C, Yamanaka Y. Lineage allocation and asymmetries in the early mouse embryo[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2003, 358: 1341-1349
- [17] 曹贵方, 张涌, 李裕强, 等 山羊胚胎的卵裂与囊胚形成的光学研究[J]. 内蒙古畜牧科学, 1999(4): 1-4
- [18] Bryja V, Bonilla S, Cajánek L, et al An efficient method for the derivation of mouse embryonic stem cells [J]. Stem Cells, 2006, 24: 844-849
- [19] Peng H M, Chen G A. Serum-free medium cultivation to improve efficacy in establishment of human embryonic stem cell lines[J]. Hum Reprod, 2006, 21: 217-222
- [20] Tesar P J. Derivation of germ-line-competent embryonic stem cell lines from preblastocyst mouse embryos[J]. Proc Nat Acad Sci U S A, 2005, 102: 8239-8244
- [21] Buehr M, Nichols J, Stenhouse F, et al Rapid loss of oct4 and pluripotency in cultured rodent blastocysts and derivative cell lines[J]. Biol Reprod, 2003, 68: 222-229