

猪有腔卵泡发育和闭锁中颗粒细胞凋亡与 卵泡液类固醇激素的变化

林鹏飞^{1,2}, 剧世强¹, 罗碧平¹, 郝元斌¹, 王利勤¹, 芮荣¹, 靳亚平²

(1 南京农业大学 动物医学院, 江苏 南京 210095; 2 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 【目的】研究猪有腔卵泡发育和闭锁中颗粒细胞凋亡与卵泡液类固醇激素的变化, 为了解猪有腔卵泡发育与闭锁的调控机理提供参考。【方法】从猪卵巢分离完整有腔卵泡, 按质量分为健康卵泡、早期闭锁卵泡和晚期闭锁卵泡 3 类; 再按卵泡直径大小分为大卵泡组(>5 mm)、中卵泡组($3\sim 5$ mm)和小卵泡组(<3 mm) 3 组, 制作完整有腔卵泡的石蜡切片, HE 染色后观察其形态学变化。应用 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞仪检测壁层颗粒细胞凋亡情况, 放射免疫测定法(RIA)分析卵泡液中雌二醇(E_2)和孕酮(P_4)浓度的变化。【结果】不同大小健康卵泡内均存在少量的凋亡颗粒细胞, 卵泡闭锁时颗粒细胞凋亡率显著增加, 小卵泡表现尤为明显; 晚期闭锁小卵泡中约有 60% 的颗粒细胞发生凋亡。健康大卵泡组 E_2 浓度显著高于中、小卵泡组, P_4 浓度与中卵泡组无差异, 但显著低于小卵泡组。卵泡闭锁时不同大小卵泡均表现出 E_2 浓度显著下降和 P_4 浓度显著增加。中、小健康卵泡的卵泡液中 $P_4/E_2 < 5$, 而健康大卵泡中 $P_4/E_2 < 1$; 早期闭锁大卵泡卵泡液中 $P_4/E_2 > 1$, 而早期闭锁中、小卵泡中 P_4/E_2 在 $5\sim 15$; 当 $P_4/E_2 > 15$ 时, 卵泡则处于晚期闭锁状态。【结论】颗粒细胞凋亡是卵泡闭锁的主要诱因, 但卵泡闭锁程度因卵泡大小而异, 小卵泡似乎更易发生闭锁; 卵泡液中 P_4/E_2 可作为判定有腔卵泡质量的一个标准。

[关键词] 猪; 有腔卵泡; 颗粒细胞凋亡; 孕酮; 雌二醇

[中图分类号] S814.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2011)03-0028-06

Analysis of the granulosa cells apoptosis and the changes of hormone during porcine follicular development and atresia

LIN Peng-fei^{1,2}, JU Shi-qiang¹, LUO Bi-ping¹, HAO Yuan-bin¹,
WANG Li-qin¹, RUI Rong¹, JIN Ya-ping²

(1 College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China;

2 College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】This study was to analyse the relationship between the apoptotic granulosa cells and the levels of steroids of porcine follicle during development and atresia, so as to supply experimental data for further revealing of the regulatory mechanism of follicular development and atresia. 【Method】The whole antral follicles were isolated from porcine ovaries and classified as follows: healthy follicles, early atretic follicles and progressed atretic follicles, then divided into 3 groups according to the follicular diameter: large follicles (>5 mm), medium follicles ($3\sim 5$ mm) and small follicles (<3 mm). The paraffin section was prepared for porcine intact antral follicle, and the morphological characteristic of porcine antral

* [收稿日期] 2010-08-14

[基金项目] 国家高技术研究与发展计划项目(2008AA101003); 国家基础研究发展规划(973)项目(2007CB947403); 教育部博士点基金项目(200807120022)

[作者简介] 林鹏飞(1982—), 男, 内蒙古乌盟人, 讲师, 博士, 主要从事动物生殖生物学研究。E-mail: linpengfei@nwsuaf.edu.cn

[通信作者] 芮荣(1962—), 男, 安徽当涂人, 教授, 博士, 主要从事动物生殖生物学与生殖疾病控制研究。

E-mail: rrui@njau.edu.cn

靳亚平(1966—), 男, 陕西宝鸡人, 教授, 博士, 主要从事动物生殖内分泌与生殖免疫学研究。

E-mail: yapingjin@163.com

follicles was observed using HE staining. The percentage of apoptotic granulosa cells was examined using Annexin V-FITC/PI double-labeling, so was the concentrations of estradiol (E_2) and progesterone (P_4) in follicular fluid of cultured above different-sized follicles using radioimmunoassay. 【Result】 There were limited numbers of apoptotic granulosa cells in the healthy follicles of different sizes, and the percentage of the apoptotic granulosa cells was significantly increased during follicular atresia, especially in small follicles. About 60% of granulosa cells became apoptosis in progress atretic small follicles. In healthy large follicles, the concentrations of E_2 of follicular fluid was significantly higher than that in the medium and small follicles, the concentration of P_4 showed no difference with the medium follicles but was significantly lower than that in the small follicles. The concentrations of estradiol (E_2) significantly declined and progesterone (P_4) concentrations significantly increased between healthy and early atretic follicles regardless of follicle size. P_4/E_2 was less than 5 in follicular fluid of healthy medium and small follicles, but the P_4/E_2 was less than 1 in follicular fluid of healthy large follicles. P_4/E_2 was more than 1 in follicular fluid of early atretic large follicles, however, P_4/E_2 was between 5 to 15 in early atretic medium and small follicles, when the ratio was over 15, then the follicles became the progress atretic state. 【Conclusion】 Granulosa cells apoptosis is the main cause of follicular atresia, the degree of which varies with the size of follicles, and small follicles seem to be easier atretic than medium and large follicles. The concentrations P_4/E_2 of follicular fluid can be determined as a standard of the quality of antral follicles.

Key words: swine; antral follicles; granulosa cells apoptosis; estradiol; progesterone

随着细胞凋亡研究的逐渐深入,人们已认识到卵泡闭锁的实质就是颗粒细胞凋亡,并先后在多种动物上得到证实^[1-2]。虽然卵泡闭锁早期的主要标志为颗粒细胞凋亡,但由于卵泡闭锁时个体年龄及卵泡发育阶段不同,因此形成闭锁的具体机制可能存在差异。细胞发生凋亡时,细胞膜的改变远早于DNA的变化,此时只分布于细胞膜脂质双层内侧的磷脂酰丝氨酸(Phosphatidylserine, PS)转移至外侧,这一改变被认为是细胞凋亡早期的特异性变化^[3]。磷脂结合蛋白V(Annexin V)是一种分子质量为35~36 ku的 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白,它与PS有高度亲和力,用标记了异硫氰酸荧光素(Fluorescein isothiocyanate, FITC)的Annexin V作为荧光探针检测细胞凋亡,能够较检测细胞核改变更早地辨别细胞凋亡的发生。碘化丙啶(Propidium iodide, PI)是一种核酸染料,分子质量较大,它不能透过完整的细胞膜,由于早期凋亡细胞的细胞膜尚未受到破坏,PI不能透过细胞膜,而晚期凋亡细胞的细胞膜已发生溶解,PI能够透过细胞膜而使细胞核染红。因此用Annexin V-FITC/PI双染法可明确地将健康细胞、早期凋亡细胞和晚期凋亡细胞3个细胞群体分开。

大量的研究表明,雌二醇(Estradiol, E_2)在卵巢中具有促进颗粒细胞增殖及调节卵泡细胞分化等作用,是卵泡生长发育和颗粒细胞存活的重要因子^[4]。

E_2 可以抑制小卵泡和腔前卵泡的闭锁,并能促进大卵泡的成熟,在 E_2 分泌不足的卵泡中,颗粒细胞增殖和卵泡发育会受到抑制。在体外培养试验中, E_2 的释放量是卵泡正常发育的重要评价指标。Billig等^[5]在垂体切除的性成熟前大鼠皮下埋植己烯雌酚,2 d后撤除己烯雌酚埋植物,12 h后发现颗粒细胞凋亡率增加,同时大量的腔前卵泡发生闭锁。Mihm等^[6]报道,与即将闭锁的卵泡相比,牛优势化卵泡可以分泌更多的 E_2 ,卵泡液中 E_2 的浓度与卵泡健康程度呈正相关。体内试验表明,血清中高水平的孕酮(Progesterone, P_4)能够缩短卵泡波之间的间隔,并且认为 P_4 主要通过抑制促黄体素(Luteinizing hormone, LH)的波动频率而促进卵泡的退化^[7]。而LH能够刺激大鼠排卵前卵泡和体外培养的颗粒细胞中孕酮受体mRNA及其蛋白的表达^[8]。Jolly等^[9]研究表明,卵泡液中 E_2 水平与颗粒细胞DNA断裂的程度呈反向线性关系,而卵泡液中 P_4 与DNA断裂有弱的正向线性关系。 $E_2/P_4 \leq 1$ 卵泡液中的DNA断裂程度是 $E_2/P_4 > 1$ 卵泡的4倍,这预示卵泡液中 P_4 与 E_2 的比值可以反映卵泡的健康状态。Manabe等^[10]测定了3~5 mm猪卵泡中 P_4 和 E_2 的浓度,认为 $P_4/E_2 < 15$ 的为健康卵泡, $P_4/E_2 > 15$ 为闭锁卵泡。但在有腔卵泡的不同发育过程中,卵泡液类固醇激素与颗粒细胞凋亡的关系迄今鲜见报道。本研究以猪为试验动物,研究了有

腔卵泡在发育和闭锁过程中其形态学变化特征、颗粒细胞凋亡率以及卵泡液中类固醇激素浓度变化之间的关系,以期为进一步研究卵泡发育和闭锁的内在机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 试 剂

试验所用各种试剂除特别说明外,均为 SIGMA 产品。

1.2 完整有腔卵泡的分离及分组

猪卵巢采自南京市哈慈天环食品有限公司下属屠宰场,置于 37 ℃ 无菌生理盐水(含青霉素、链霉素各 500 IU/mL)中,2 h 内送达实验室。在无菌条件下,用杜氏磷酸盐缓冲液(Dulbecco's phosphate buffered saline, PBS)清洗卵巢 2~3 次后,放入盛有适量 PBS 的平皿中,先用眼科剪剪去卵巢周围多余组织及系膜,再沿系膜缘将卵巢剪开,然后用眼科镊仔细剥离有腔卵泡,尽量去除其周围的结缔组织。将剥离好的完整卵泡置于 PBS 中,淘汰有破漏的卵泡和操作中被破坏了原有形态的卵泡,按卵泡直径大小将其分为 3 组:大卵泡组(>5 mm)、中卵泡组(3~5 mm)、小卵泡组(<3 mm)。在实体显微镜下观察卵泡的形态,按质量将所分离卵泡又分为 3 组:(1)健康卵泡。卵泡壁结构完整、均匀、紧密,略呈粉红色或黄色,毛细血管分布均匀、色泽鲜红,卵泡液清亮,一般可见到卵丘。(2)早期闭锁卵泡。卵泡壁结构较均匀,但内层稍呈絮状化,或壁上有少量暗色斑块,卵泡略呈灰白色,血管较少或血管较粗大、颜色变淡,卵泡液稍混浊,少数可见到卵丘。(3)晚期闭锁卵泡。卵泡壁结构不均匀,颜色灰暗,毛细血管较少,内部絮状化严重或可见到卵泡内部有暗色的团块,卵丘一般不可见^[11-12]。

1.3 猪有腔卵泡切片的制备及 HE 染色

采用改进的切片制作方法^[13]分别制备上述各组有腔卵泡的切片,常规 HE 染色,封片后在光镜下观察。

1.4 猪有腔卵泡颗粒细胞和卵泡液的收集

将 8 个同一分组卵泡放在一起,使用眼科镊撕开卵泡轻轻刮取壁层颗粒细胞,添加少许 4 ℃ 预冷的 PBS 混匀后,取部分颗粒细胞立即进行 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测。将每 24 个同一分组卵泡放在一起,轻轻撕破卵泡,用吸管吸取全部卵泡液和颗粒细胞,置于离心管内,以 1 500 r/min 离心 5 min,收集上清卵泡液,-20 ℃ 保存用于激素测定。

1.5 Annexin V-FITC/PI 颗粒细胞凋亡检测

颗粒细胞凋亡率测定按 BIPEC Bioreagent 凋亡试剂盒产品说明书进行。将颗粒细胞立即用 4 ℃ 预冷的 PBS 液离心洗涤 2 次,去除 PBS;用 PBS 调整细胞密度至 1×10^6 mL⁻¹后,每毫升细胞中加入 400 μ L Binding Buffer 悬浮细胞;加入 5 μ L Annexin V-FITC,涡旋混匀,置于 4 ℃ 条件下避光反应 15 min;添加 10 μ L PI,于 4 ℃ 条件下避光反应 5 min,1 h 内进行流式细胞仪分析。每份样品检测 10 000 个细胞,所获数据经 BD FACSDivaTM software 软件处理后,换算为细胞凋亡比例。在二维 FCM 分析图上,细胞分为 4 个亚群:左下象限为 Annexin V-FITC⁻/PI⁻(Q3)活细胞群;右下象限为 Annexin V-FITC⁺/PI⁻(Q4)早期凋亡细胞;右上象限为 Annexin V-FITC⁺/PI⁺(Q2)晚期凋亡和坏死细胞;左上象限为 Annexin V-FITC⁻/PI⁺(Q1)操作过程中发生机械损伤的细胞。

1.6 卵泡液雌二醇和孕酮浓度的测定

采用北京北方生物技术研究所以生产的孕酮、雌二醇放射免疫分析试剂盒,测定卵泡液中孕酮、雌二醇的浓度。具体测定工作由南京军区总医院放射科完成。

1.7 数据统计分析

所有试验至少重复 3 次,数据均以“平均值±标准误”表示;采用 SPSS(Version 13.0;SPSS, Inc., Chicago, IL)统计软件 One-Way ANOVA 中 Fisher's LSD 法,进行差异显著性检验或独立样本 *t* 检验分析, $P < 0.05$ 判为差异显著。

2 结果与分析

2.1 猪有腔卵泡发育与闭锁的形态学变化

各组猪有腔卵泡的形态学特征见图 1。大、中、小健康卵泡的卵泡壁各层结构完整、层次清晰,基膜与颗粒细胞层结合紧密;颗粒细胞彼此结合紧密,卵泡腔无脱落的颗粒细胞;颗粒细胞的体积较大,胞质及细胞核染色均匀,核位于细胞中央,只有少量染色质边缘化细胞核位于颗粒细胞内层,而在泡膜层和颗粒细胞外层没有观察到凋亡的细胞(图 1 a-b)。卵母细胞包被多层紧密的卵丘细胞,紧贴于颗粒细胞层上,没有观察到凋亡的卵丘细胞(图 1 b)。早期闭锁卵泡中,颗粒细胞间彼此结合松散,颗粒细胞内层的细胞大量发生凋亡,最内层的颗粒细胞脱落于卵泡腔中,脱落的颗粒细胞中可见典型的半月型结构(图 1 c-d)。早期闭锁卵泡颗粒细胞层与泡膜层

连接依然紧密,基膜完整;部分早期闭锁小卵泡中卵丘-卵母细胞复合体(Cumulus-oocyte complexes, COC)与颗粒细胞层分离,游离于卵泡腔中,但未见卵丘细胞发生凋亡(图 1 d)。晚期闭锁卵泡中,颗粒细胞部分或全部脱落于卵泡腔中,细胞体积缩小、核膜皱缩、染色质凝集,或碎裂为闭锁小体;泡膜层变

形、松弛,外围有少量脱落细胞,与颗粒细胞层之间的界限模糊、基膜消失(图 1 e)。晚期闭锁的后期,因为巨噬细胞侵入到卵泡腔中,核浓缩颗粒细胞减少(图 1 f)。在整个卵泡闭锁过程中没有观察到卵母细胞和卵丘细胞发生凋亡。卵泡闭锁过程中,大、中、小卵泡的细胞形态学特征无肉眼可见的明显差异。

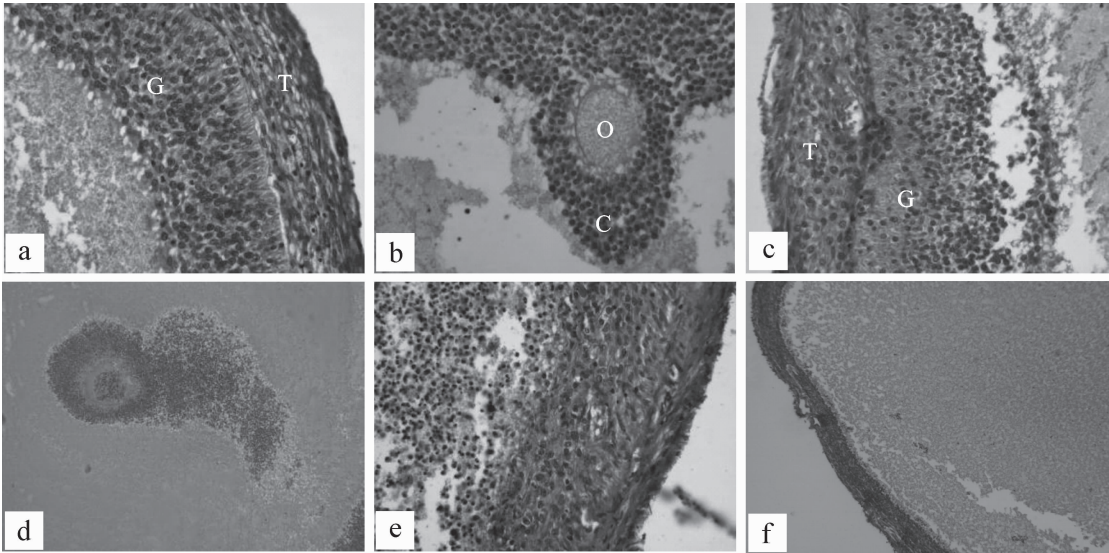


图 1 猪有腔卵泡 HE 染色的形态学特征
a,b. 健康卵泡;c,d. 早期闭锁卵泡;e,f. 晚期闭锁卵泡;a,b,c,e. $\times 400$;d. $\times 40$;f. $\times 100$;
T. 泡膜细胞;G. 颗粒细胞;O. 卵母细胞;C. 卵丘细胞

Fig. 1 Morphological feature of porcine antral follicle by HE staining
a,b. Healthy follicles;c,d. Early atretic follicles;e,f. Progress atretic follicles;a,b,c,e. $\times 400$;d. $\times 40$;f. $\times 100$;
T. Thecal cells;G. Granulosa cells;O. Oocyte;C. Cumulus cells

2.2 不同发育阶段猪有腔卵泡中颗粒细胞凋亡检测 Annexin V-FITC/PI 双染色的凋亡结果。

表 1 为不同发育阶段猪有腔卵泡中颗粒细胞用

表 1 不同发育阶段猪有腔卵泡中颗粒细胞的 Annexin V-FITC/PI 双染凋亡检测结果
Table 1 Results of Annexin V-FITC/PI staining examination for porcine granulosa cells derived from different-sized antral follicles

卵泡质量 Follicular quality	卵泡大小 Follicular size	晚期凋亡及坏死颗粒细胞 Progressed atretic and necrotic cells	早期凋亡颗粒细胞 Early apoptotic cells	活颗粒细胞 Survival cells
健康卵泡 Healthy follicles	大卵泡 Large follicles	1.80 $\pm$ 0.30 a	4.65 $\pm$ 1.05 a	92.65 $\pm$ 1.65 a
	中卵泡 Medium follicles	3.10 $\pm$ 0.40 a	5.40 $\pm$ 0.70 a	90.90 $\pm$ 1.70 ab
	小卵泡 Small follicles	2.45 $\pm$ 0.55 a	7.70 $\pm$ 1.80 a	89.70 $\pm$ 2.40 ab
早期闭锁卵泡 Early atretic follicles	大卵泡 Large follicles	11.65 $\pm$ 2.55 bc	7.30 $\pm$ 1.60 a	81.00 $\pm$ 4.20 bd
	中卵泡 Medium follicles	7.25 $\pm$ 1.05 ab	17.70 $\pm$ 2.60 c	75.00 $\pm$ 3.70 d
	小卵泡 Small follicles	11.50 $\pm$ 2.20 bc	30.65 $\pm$ 3.55 e	57.20 $\pm$ 1.90 f
晚期闭锁卵泡 Progress atretic follicles	中卵泡 Medium follicles	17.05 $\pm$ 3.25 cd	26.80 $\pm$ 1.30 d	56.05 $\pm$ 4.55 f
	小卵泡 Small follicles	24.50 $\pm$ 3.40 d	34.50 $\pm$ 1.00 e	40.75 $\pm$ 2.65 h

注:同列数据后标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。下表同。
Note: Different lowercase letters within the same column indicate significant difference($P<0.05$). The same below.

由表 1 可知,随闭锁阶段的推进,不同大小卵泡颗粒细胞凋亡率显著上升($P<0.05$),小卵泡表现更为明显;健康卵泡中也存在少量的凋亡颗粒细胞,不同大小卵泡间无显著差异。在早期闭锁卵泡中,小卵泡颗粒细胞的活细胞比例显著低于大、中卵泡($P<0.05$);中卵泡活细胞比例与大卵泡无显著差异,但早期凋亡颗粒细胞比例显著高于大卵泡($P<0.05$)。在晚期闭锁卵泡中,小卵泡颗粒细胞的活细

胞比例降至 $(40.75 \pm 2.65)\%$,显著低于中卵泡($P<0.05$)。与早期闭锁小卵泡组相比,晚期闭锁小卵泡组早期凋亡颗粒细胞比例无显著差异,但晚期凋亡及坏死颗粒细胞比例显著增加($P<0.05$)。

2.3 不同发育阶段猪有腔卵泡中 P_4 和 E_2 浓度的变化

由表 2 可知,健康卵泡中,大卵泡卵泡液 E_2 浓度显著高于中、小卵泡($P<0.05$); P_4 浓度与中卵泡组无显著差异,但显著低于小卵泡组($P<0.05$)。

表 2 不同发育阶段猪有腔卵泡卵泡液中 P_4 和 E_2 浓度的变化
Table 2 The concentrations of P_4 and E_2 of follicular fluid isolated from different-sized antral follicles

卵泡大小 Follicular size	卵泡质量 Follicular quality	$P_4/(\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1})$	$E_2/(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$	P_4/E_2
大卵泡 Large follicles	健康卵泡 Healthy follicles	$8.36 \pm 0.36 \text{ a}$	$11\ 566.45 \pm 1\ 356.13 \text{ a}$	$0.74 \pm 0.08 \text{ a}$
	早期闭锁卵泡 Early atretic follicles	$18.23 \pm 0.69 \text{ bc}$	$7\ 035.27 \pm 674.60 \text{ c}$	$2.68 \pm 0.48 \text{ b}$
中卵泡 Medium follicles	健康卵泡 Healthy follicles	$9.37 \pm 1.10 \text{ a}$	$7\ 292.6 \pm 135.26 \text{ c}$	$1.29 \pm 0.15 \text{ ab}$
	早期闭锁卵泡 Early atretic follicles	$20.75 \pm 1.38 \text{ c}$	$3\ 245.94 \pm 324.56 \text{ e}$	$6.63 \pm 1.18 \text{ c}$
	晚期闭锁卵泡 Progress atretic follicles	$26.70 \pm 1.06 \text{ d}$	$1\ 023.82 \pm 173.64 \text{ f}$	$28.12 \pm 5.38 \text{ ef}$
小卵泡 Small follicles	健康卵泡 Healthy follicles	$11.81 \pm 0.97 \text{ b}$	$5\ 883.88 \pm 571.26 \text{ cd}$	$2.08 \pm 0.38 \text{ b}$
	早期闭锁卵泡 Early atretic follicles	$25.25 \pm 1.25 \text{ cd}$	$1\ 838.1 \pm 121.14 \text{ f}$	$13.89 \pm 1.34 \text{ d}$
	晚期闭锁卵泡 Progress atretic follicles	$31.64 \pm 0.57 \text{ e}$	$847.84 \pm 144.51 \text{ g}$	$39.50 \pm 6.44 \text{ f}$

3 讨 论

使用 PI 染色检测 DNA 含量是最早的细胞凋亡定量检测方法^[14]。细胞凋亡早期尽管有 DNA 断裂点形成,但尚未出现 DNA 片段的大量丢失,因此 PI 法不能检出早期凋亡细胞,其凋亡检出率要显著低于 TUNEL 法及 Annexin V/PI 法。进入 20 世纪 90 年代,检测 DNA 断裂点的 TUNEL 技术成为凋亡定量检测的主要方法,该法凋亡检出率虽与 Annexin V/PI 法无差异,但细胞需要先进行固定,操作较繁琐^[15],且细胞发生凋亡时,细胞膜上 PS 外翻早于 DNA 断裂,因此 Annexin V/PI 法对早期凋亡的检出率优于 TUNEL 法,细胞也不需要固定,避免了因固定而造成的细胞碎片过多及 DNA 片段的丢失,被认为是目前细胞凋亡定量检测的首选方法。

在不同哺乳动物卵巢上,卵泡闭锁过程中颗粒细胞及泡膜细胞最初发生凋亡的位置存在物种特异性^[16-17]。Nakayama 等^[17]首先在牛颗粒细胞内层中观察到大量的细胞发生凋亡;而羊卵泡在闭锁早期时,凋亡发生于颗粒细胞和膜内层细胞中^[12];大鼠卵泡中凋亡的颗粒细胞常见于 COC 附近及 COC 与卵泡壁连接处,在卵泡闭锁后期,卵丘细胞发生凋亡但没有观察到卵母细胞发生退化,泡膜细胞层中有少量细胞发生凋亡^[16]。这种物种特异性表明,在卵泡闭锁过程中,不同物种在调节颗粒细胞凋亡的局

部机制上存在差异性,而且在卵泡闭锁时不同物种间的凋亡诱导因子和存活因子可能存在差异。本试验结果表明,猪卵泡闭锁时首先是位于卵泡腔周围的颗粒细胞发生凋亡,推测介导颗粒细胞凋亡的主要凋亡因子可能存在于卵泡液中,且在猪早期闭锁卵泡中没有观察到泡膜内层细胞凋亡,可能是因为膜细胞内层分布有大量的小血管和毛细血管,它们能为这个区域的细胞提供各种激素和细胞因子;晚期闭锁卵泡中颗粒细胞部分或全部脱落于卵泡腔中碎裂为闭锁小体,泡膜内层细胞出现凋亡,在整个卵泡闭锁过程中没有观察到卵母细胞和卵丘细胞发生凋亡;猪不同大小健康卵泡中均存在少量的早期凋亡颗粒细胞,随卵泡直径的增加凋亡颗粒细胞数呈下降趋势,但差异不显著;当卵泡发生闭锁时,颗粒细胞凋亡率显著上升,小卵泡表现尤为明显,晚期闭锁小卵泡中颗粒细胞凋亡率已达 60%,进一步证实了猪有腔卵泡闭锁过程中存在颗粒细胞凋亡现象,颗粒细胞凋亡程度能够反映卵泡健康程度。

许多研究表明,类固醇激素在卵泡的生长和闭锁过程中起着重要的调节作用,给动物注射外源性雌激素时,闭锁卵泡的数量下降^[18]。本试验结果显示, E_2 和 P_4 浓度在健康和闭锁卵泡卵泡液中有显著差异。健康卵泡中,大卵泡 E_2 浓度显著高于中、小卵泡,其浓度约是小卵泡组的 2 倍;而大卵泡 P_4 的浓度与中卵泡无显著差异,但显著低于小卵泡;随

着卵泡闭锁进程的推进,不同大小卵泡 E_2 浓度均显著降低,而 P_4 的浓度明显增加。与颗粒细胞凋亡率对比发现,卵泡闭锁时类固醇激素浓度的变化似乎更加明显。Guthrie 等^[19]将 E_2 水平变化和颗粒细胞凋亡时 DNA 固缩程度进行对比后也发现, E_2 合成和分泌能力的降低出现在颗粒细胞大量发生核固缩之前。推测可能的原因是,颗粒细胞大量的凋亡及引起的芳香化酶活性和细胞色素 P450 芳香酶 mRNA 表达量的下降,造成 E_2 合成受阻。Tilly 等^[20]在猪卵泡中的研究也证实, $P450_{arom}$ 主要在健康卵泡的颗粒细胞中表达,卵泡闭锁后即检测不到相关的表达。CYP19 基因所编码的芳香化酶是雌激素产生的关键酶,Kozłowska 等^[21]研究表明,早期闭锁卵泡中 CYP19 mRNA 显著下降,而晚期闭锁卵泡中变化不明显。卵泡闭锁虽然降低了颗粒细胞的存活率,但也促进了泡膜细胞合成 P_4 。同时,卵泡闭锁时未芳香化的雄激素不仅能抑制芳香化酶的活性,还能刺激颗粒细胞中 P_4 的合成^[22]。这些研究结果均表明,与健康卵泡相比,闭锁卵泡中的 E_2 浓度降低,而 P_4 浓度升高; E_2 的分泌量下降也是决定闭锁发生的重要因素,在卵泡闭锁刚发生或尚未发生前 E_2 下降就已经决定了卵泡的命运。

在近年来关于卵泡闭锁的研究中,用卵泡液中 P_4 和 E_2 浓度的比值来确定卵泡闭锁程度的方法被广泛接受和普遍运用^[23]。本研究发现,与中、小卵泡相比,大卵泡卵泡液中 P_4/E_2 的变化幅度较小,用 P_4/E_2 作为卵泡健康程度划分标准时,不同大小卵泡间存在差异。对中、小卵泡而言,健康卵泡卵泡液中 $P_4/E_2 < 5$,随着卵泡闭锁程度的增加,卵泡液中 E_2 的浓度降低,而 P_4 的浓度升高,早期闭锁卵泡液中 P_4/E_2 为 5~15,晚期闭锁卵泡液中 $P_4/E_2 > 15$ 。大卵泡卵泡液中 $P_4/E_2 < 1$ 时,卵泡处于健康状态,当 $P_4/E_2 > 1$ 时卵泡已发生早期闭锁。

〔参考文献〕

- [1] Manabe N, Goto Y, Matsuda-Minehata F, et al. Regulation mechanism of selective atresia in porcine follicles; Regulation of granulosa cell apoptosis during atresia [J]. J Reprod Dev, 2004, 50(5): 493-514.
- [2] Matsuda-Minehata F, Inoue N, Goto Y, et al. The regulation of ovarian granulosa cell death by pro- and anti-apoptotic molecules [J]. J Reprod Dev, 2006, 52(6): 695-705.
- [3] Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, et al. A novel assay for apoptosis; Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V [J]. J Immunol Methods, 1995, 184(1): 39-51.
- [4] Couse J F, Yates M M, Deroo B J, et al. Estrogen receptor- β is critical to granulosa cell degeneration and the ovulatory response to gonadotropin [J]. Endocrinology, 2005, 146: 3247-3262.
- [5] Billig H, Furuta I, Hsueh A J W. Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis [J]. Endocrinology, 1993, 133: 2204-2212.
- [6] Mihm M, Austin E J, Good T E M, et al. Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of dominant follicles in heifers [J]. Biol Reprod, 2000, 63: 811-819.
- [7] Menchaca A, Rubianes E. Relation between progesterone concentrations during the early luteal phase and follicular dynamics in goats [J]. Theriogenology, 2002, 57: 1411-1419.
- [8] Natraj U, Richards J S. Hormonal regulation, localization, and functional activity of the progesterone receptor in granulosa cells of rat preovulatory follicles [J]. Endocrinology, 1993, 133(2): 761-769.
- [9] Jolly P D, Tisdall D J, Heath D A, et al. Apoptosis in bovine granulosa cells in relation to steroid synthesis, cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate response to follicle stimulating hormone and luteinizing hormone and follicular atresia [J]. Biol Reprod, 1994, 51(2): 934-944.
- [10] Manabe N, Myoumoto A, Kimura Y, et al. Regulatory mechanisms of granulosa cell apoptosis in porcine ovarian follicle atresia [J]. Reproductive Biology Update, 1998, 12(2): 23-35.
- [11] Alonso-Pozos I, Rosales-Torres A M, Ávalos-Rodriguez A, et al. Mechanism of granulosa cell death during follicular atresia depends on follicular size [J]. Theriogenology, 2003, 60: 1071-1081.
- [12] Jolly P D, Smith P R, Heath D A, et al. Morphological evidence of apoptosis and the prevalence of apoptotic versus mitotic cells in the membrana granulosa of ovarian follicles during spontaneous and induced atresia in ewes [J]. Biol Reprod, 1997, 56(4): 837-846.
- [13] 林鹏飞, 芮荣. 猪分离卵泡石蜡切片制作的改进 [J]. 畜牧与兽医, 2010, 42(6): 52-53.
- [14] Lin P F, Rui R. The approach to paraffin section preparation for porcine isolated follicles [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2010, 42(6): 52-53. (in Chinese)
- [15] Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci M C, et al. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry [J]. J Immunol Methods, 1991, 139: 271-279.
- [16] Gorczyca W, Gong J P, Darzynkiewicz Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assay [J]. Cancer Res, 1993, 53: 1945-1951.
- [17] Tabarowski Z, Szoltys M, Bik M, et al. Atresia of large ovarian follicles of the rat [J]. Folia Histochemica Cyto, 2005, 43(1): 43-50.