

磷酸二酯酶亚型抑制剂与细胞周期蛋白抑制剂对绵羊卵母细胞体外成熟的影响

周波^{1,2} 洪海燕² 旭日干¹ 夏国良²

(1. 内蒙古大学 哺乳动物生殖生物学与生物技术教育部重点实验室,呼和浩特 010021
2. 中国农业大学 生物学院,北京 100094)

摘要 选用磷酸二酯酶 3(PDE3)特异性抑制剂 Milrinone 和 PDE4 特异性抑制剂 Rolipram 以及细胞周期蛋白依赖性激酶(cdk)抑制剂 Roscovitine(ROSC)对绵羊卵丘卵母细胞复合物(COCs)的体外自发成熟进行研究,拟建立一种模拟体内卵泡环境的绵羊卵母细胞体外培养模型。以 M-199 为基础培养液,绵羊 COCs 在含有 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 Milrinone、Rolipram、ROSC 或不含上述任何抑制剂的培养液中分别培养 24 h。COCs 在含有 50 $\mu\text{mol/L}$ ROSC 的培养液中培养 24 h,转移到含有 20 IU/L FSH 的培养液继续培养 24 h 检查核相。结果表明:COCs 在 M-199 基础培养液和含有 Rolipram 的培养液中都可以自发恢复减数分裂,但是在含有 Milrinone 或 ROSC 的培养液中减数分裂受到阻滞;并且 ROSC 对绵羊 COCs 体外自发成熟的抑制作用要远高于 Milrinone($P < 0.05$)。当 COCs 从 ROSC 转移到含有 20 IU/L FSH 的培养液继续培养 24 h 后,90.4% 卵母细胞恢复到第 2 次减数分裂中期(M_{II})。上述结果表明 PDE3 和 cdk 在绵羊减数分裂恢复中具有重要的作用。

关键词 减数分裂;绵羊卵母细胞;磷酸二酯酶;细胞周期蛋白依赖性激酶

中图分类号 Q 492.5

文章编号 1007-4333(2005)01-0001-05

文献标识码 A

Effect of the inhibitor of cdk and specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors on ovine oocytes meiotic maturation in vitro

Zhou Bo^{1,2}, Hong Haiyan², Shorgan Bou¹, Xia Guoliang²

(1. Key Laboratory of Mammal Reproductive Biology and Biotechnology, Ministry of Education, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China; 2. College of Biological Science, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract The present works studied the effect of inhibitor of cdk and specific inhibitors of phosphodiesterase on ovine oocyte maturation. Milrinone and Rolipram are specific PDE inhibitors and Roscovitine(ROSC) is a selective inhibitors of the cyclin dependent kinase. These chemicals are selected to evaluated the effect on meiotic resumption of ovine oocytes for 24 h in vitro. Oocytes that treated with ROSC for 24 h and subsequently allowed to undergo maturation for 24 h in the absence of the inhibitor media but have FSH(20 IU/L). Immature ovine cumulus oocyte complexes were recovered from ovaries collected at the abattoir. The doses of inhibitors was 50 $\mu\text{mol/L}$ in medium. At the end of the incubation, COC were denuded and oocytes werethen fixed and classified according to the status of nuclear maturation. The results revealed that both PDE3 inhibitor Milrinone and cdk inhibitor ROSC prevented oocyte spontaneous meiotic maturation. In contrast, the PDE4 inhibitor Rolipram had no effect. And ROSC have a high effect to maintain ovine oocytes in meiotic arrest than Milrinone. These results suggests that type 3 PDE and cyclin dependent kinase have an important role in meiotic resumption of ovine oocytes, but the mechanisms underlying these effects are different and require further characterization.

Key words meiosis; ovine oocyte; phosphodiesterase; cyclin dependent kinase(cdk)

绵羊卵母细胞在胎儿期起始第 1 次减数分裂, 并且停滞在第 1 次减数分裂的双线期,直到促性腺

收稿日期: 2004-09-03

基金项目: 教育部重点实验室基金资助项目

作者简介: 周波,博士研究生;旭日干,教授;夏国良,教授,通讯作者,主要从事动物生殖生物学研究。

激素诱导减数分裂恢复。绵羊发情内促性腺激素使卵巢上许多卵泡被募集,发育并增长,这些卵泡中会出现数个优势卵泡,而大量的次级卵泡将发生闭锁退化。现阶段哺乳动物卵母细胞减数分裂阻滞和恢复的机制尚未被完全阐释清楚。为了研究绵羊卵母细胞的成熟机制,对从屠宰场取回的卵巢卵泡中得到的绵羊卵丘卵母细胞复合物(COCs)进行了抑制培养,其作用是增加体外成熟的卵母细胞的发育能力。这些从卵巢上可见卵泡中获得的卵母细胞处于不同的发育状态,经过短时抑制可给卵母细胞一定的时间用以合成并贮藏或修饰已合成的核苷酸和蛋白质,这些蛋白质和核苷酸对于卵母细胞的受精和后期发育是必需的。这种抑制培养的方法可以用于模拟体内卵泡的正常生理状态下各种激素或因子对卵母细胞减数分裂成熟作用机制的研究。随着研究的深入,Milrinone 作为磷酸二酯酶 3 (PDE3) 和 Rolipram 作为 PDE4 的新的特异性抑制剂被用于哺乳动物卵母细胞减数分裂阻滞的研究^[1-4]。PDEs 的作用是降解细胞内环核苷酸。Milrinone 和 Rolipram 可以使细胞内的 cAMP 或 cGMP 维持在一个相对高的水平。cAMP 或 cGMP 作为细胞内重要的信号分子,通过激活其下游的信号通路及其底物对卵母细胞的减数分裂阻滞和恢复发挥重要作用。与传统的 PDE 广谱抑制剂 IBMX 和非特异性的 PDE 抑制剂次黄嘌呤(HX)相比,Milrinone 和 Rolipram 具有作用的专一性,从而可以用来鉴定一定时间和空间范围内细胞中哪种 PDEs 在起作用。最近 2 种化学试剂 Butyrolactone (BL-1)^[5] 和 Roscovitine (ROSC)^[6] 作为周期依靠的蛋白激酶(cdk)抑制剂备受瞩目。牛^[7]和猪^[8]的卵母细胞经 ROSC 24 h 抑制培养后,发现卵母细胞后期的受精和发育没有受到影响;使用 BL-1 发现也有类似的结果^[9]。本实验似通过使用上述抑制剂对绵羊卵母细胞体外自发成熟抑制培养来初步鉴定绵羊卵母细胞减数分裂恢复的机制,推测绵羊卵母细胞成熟过程中可能存在的信号转导通路,为提高卵母细胞体外成熟技术,建立绵羊卵母细胞体外培养模型提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器设备

立式光学显微镜(Nikon, SMZ-10 和 SMZ-1500),相差显微镜(Nikon,日本),CO₂ 培养箱

(SAN YO),隔水式电热恒温培养箱(湖北省黄石市医疗器械厂,WMK-02),台式高速离心机(上海安亭科学机器厂,TGL-16G),低温离心机(Hettich,日本;Bechman,德国),水浴恒温箱(北京长安科学仪器厂),振荡器(江西医疗器械厂,YKH),水浴摇床(哈尔滨市东联电子开发有限公司,HZS-D)。

1.2 主要试剂及培养液配制

化学试剂除特殊说明购于 Sigma 公司的外,其余均购于日本和光纯制药株式会社,四孔培养板为 Nunc(Denmark)公司产品。配制培养液用水为新制备的六蒸水。

牛血清白蛋白 片段(BSA):称取牛血清白蛋白 V 片段 4 g,溶于 10 mL 三蒸水中。过滤除菌后,按每管 1 mL 分装。

M-199 基础培养液:称取 M-199 培养基干粉(GIBCO 公司产品)9.9 g,NaHCO₃ 2.2 g,依次溶于 1 000 mL 三蒸水中,加入双抗 10 万单位,再加入 0.4%(质量分数)的牛血清白蛋白 片段,以及 0.23 mmol/L 的丙酮酸钠。0.22 μm 过滤器过滤除菌后,分装,4℃ 保存。

Zake 固定液:冰乙酸与无水乙醇(分析纯)体积比为 1:3。

1%(质量分数)乙酸-地衣红染液:水浴加热 45 mL 冰乙酸至沸腾,加入 1 g 地衣红继续煮沸 15 min。之后,转移到室温下并逐渐冷却至室温。最后,加入 55 mL 三蒸水,置于 4℃ 备用,用前过滤。

脱色液:甘油、冰乙酸(分析纯)、三蒸水体积比为 2:2:6。磁力搅拌汇匀,置于 4℃ 备用。

Milrinone、Rolipram 和 Roscovitine 工作液:Milrinone、Rolipram 和 Roscovitine (Sigma 公司产品)用 DMSO 溶解,贮藏浓度为 10 mmol/L,工作浓度均为 50 μmol/L,DMSO 在培养基中的终浓度 1 mmol/L,置于 -20℃ 保存。

1.3 卵母细胞的采集和体外培养

卵母细胞的采集、体外培养过程如下:将取自当地屠宰场的绵羊卵巢,放于含有双抗的灭菌生理盐水中于 4 h 内带回实验室,温度保持在 25~28℃。选取直径 1~4 mm 的卵泡,在 H-TCM199(TCM-199 补充 25 mmol/L 的 HEPES,4 mg/mL 的 BSA,10 U/mL 的肝素,2 mmol/L 的丙酮酸钠,青霉素 100 IU/mL 和硫酸链霉素 100 μg/mL)的培养液中用手术刀片划开。在立式光学显微镜下检出 COCs,选取 A 级(带有数层致密卵丘细胞)和 B 级

(带有数层较松散卵丘细胞)的 COCs,在 M-199 基础培养液中洗 3 遍。COCs 培养于 38.5 °C,体积分数为 5%的 CO₂ 饱和湿度的培养箱中。四孔板中的培养液在 COCs 移入前于培养箱中预平衡 2 h。

1.4 核相的评估

COCs 培养结束后,除去其周围的卵丘细胞,将得到的裸卵(DO)用捡卵管转移到干净的载玻片上,排成 1 条直线(捡卵液滴尽量小,以 10 μL 左右为宜)。在载玻片 4 个角上各涂少量医用凡士林,使其所围面积与盖玻片面积相当。然后,将盖玻片盖在卵母细胞及凡士林上,轻轻压片,将卵母细胞压扁(注意不要将卵压碎)。将标本片平放在 Zake 固定液中,室温下固定 1~2 d 后,用 1%的乙酸地衣红染液染色约 10 min。最后,用脱色液脱色,在 Nikon 相差显微镜下观察卵母细胞的核相,并将其分为生发泡期(germinal vesicle, GV)、生发泡破裂(germinal vesicle breakdown, GVBD)、第 1 次减数分裂中期(metaphase I, M_I)、第 1 次减数分裂末期(telophase I, T_I)、第 2 次减数分裂中期(metaphase II, M_{II})和异常卵母细胞(degenerative oocytes, DE)^[10]。

1.5 试验设计

1) 将检出的 COCs 在 M-199 基础培养液中洗 3 遍,取 25~40 枚 COCs 分别置于每孔 500 μL 浓度为 50 μmol/L 的 Milrinone、Rolipram、Roscovitine 的培养液,或 M-199 基础培养液(对照)中分别培养 24 h,然后脱卵丘、固定,48 h 后染色、脱色、封片,在相差显微镜下观察核相。

2) 培养于 50 μmol/L Roscovitine (ROSC) 培养液 24 h 的 COCs,在体外用不含 Roscovitine 的 20 IU/L FSH 的 M-199 基础培养液洗 3 遍后,移入 20 IU/L FSH 的培养液继续培养 24 h,然后脱卵丘、固定,48 h 后染色、脱色、封片,在相差显微镜下观察核相。

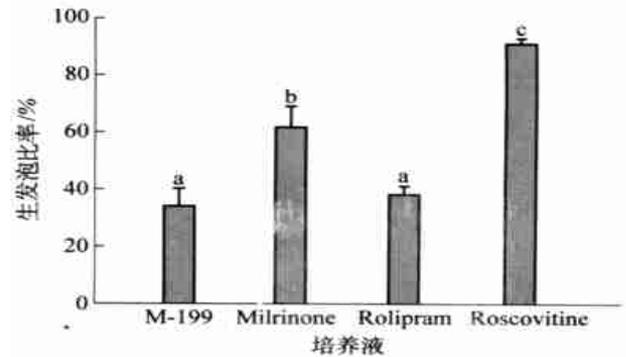
1.6 统计分析

结果用 *t* 检验进行统计分析,实验中获得的数据按 means ±SEM 形式记录, *P* < 0.05 时认为有显著差异,每组实验重复 3 次。

2 结果与结论

1) 经 Milrinone 培养液 24 h 抑制培养后,有 (61.82 ± 7.35)% 的卵母细胞处于 GV 期,与对照组 ((34.17 ± 6.24)%) 相比差异显著 (*P* < 0.05); 经

Rolipram 培养液 24 h 抑制培养后,只有 (38.31 ± 2.9)% 的卵母细胞处于 GV 期,与对照组比较无显著差异; 经 ROSC 培养液培养 24 h, (91.05 ± 1.93)% 卵母细胞处于 GV 期,与其他各组比较差异极显著 (*P* < 0.05) (图 1)。



图柱上的字母 b 和 c 与 a 比较差异显著。下同。

图 1 不同处理对绵羊卵母细胞体外减数分裂成熟的影响 (培养时间 24 h)

Fig. 1 Effect of 50 μmol/L Milrinone or Rolipram or Roscovitine or no inhibitors on ovine oocytes (meiotic maturation for 24 h incubation *in vitro*)

2) 绵羊 COCs 经 24 h ROSC 抑制培养和 24 h FSH 培养后,地衣红染色结果表明:卵母细胞绝大多数可以发生 GVBD(图 2)。处于 GV 期的卵母细胞数只占总数的 ((1.76 ± 1.02)%) ,与处于第 2 次减数分裂中期(M_{II})的卵母细胞数比较差异极显著 (*P* < 0.005)。处于第 1 次减数分裂中期(M_I)的卵母细胞数只占总数的 (0.80 ± 0.80)%,与各期核相比较差异显著 (*P* < 0.05)。不正常卵母细胞的比率较高,占总数的 (5.15 ± 2.16)%,与处于 GV、M 和 T 各期核相的卵母细胞的百分数相比差异显著 (*P* < 0.05)。COCs 经过 48 h (24 h 抑制 + 24 h FSH) 培养, (90.45 ± 2.20)% 的卵母细胞处于 M_{II} 期,与各

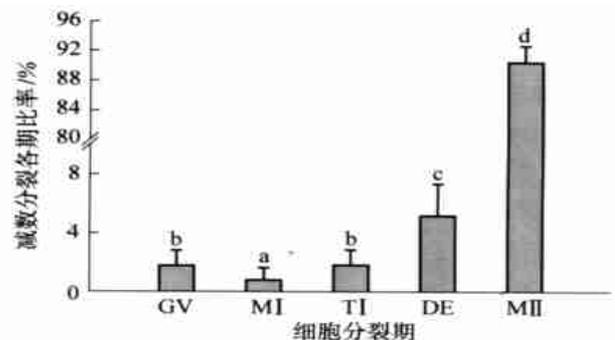


图 2 Roscovitine 对绵羊卵母细胞自发成熟抑制作用的可逆性

Fig. 2 Reversibility of inhibitory effects of Roscovitine on the spontaneous maturation of ovine COC

期核相相比差异极显著 ($P < 0.005$), 表明卵母细胞绝大多数恢复减数分裂并到达 M 期。

3 讨论

1) 抑制培养方法(两步法)的优点在于它可以提高来自小卵泡或者青春前期动物发育能力较低的卵母细胞的成熟度, 对来自小卵泡的卵母细胞减数分裂能力具有明显的促进作用, 且并不影响其后期的减数分裂恢复^[11]。

实验结果表明 Milirinone 和 ROSC 都能成功地抑制绵羊卵母细胞体外自发减数分裂恢复, 但 ROSC 比 Milirinone 的抑制效果好, 这可能是由于 ROSC 直接作用于细胞周期蛋白激酶, 直接影响减数分裂恢复; 而 Milirinone 要与卵母细胞内的 PDE3 酶发生作用, 使细胞内的环核苷酸水平上升, 再经由细胞内的 PKA 或者 PKB 信号通路^[4]以及下游信号通路与底物之间相互作用, 然后才能影响细胞的减数分裂恢复。

PDE3 主要存在于卵母细胞中, PDE4 主要存在于卵丘细胞中; 这一结论已在啮齿类动物^[1, 12]、恒河猴^[3]和牛上^[13-14]得到证实, 尚未证实羊也存在 PDE 的这种区域分布。本实验假定绵羊卵母细胞上也存在 PDE3, 用 PDE3 特异性抑制剂 Milirinone 进行抑制培养实验结果表明, 绵羊卵母细胞上至少存在 PDE3。本研究结果还表明, Milirinone 可以抑制体外培养绵羊卵母细胞减数分裂成熟, 而 Rolipram 不能抑制体外培养的绵羊卵母细胞减数分裂恢复。有实验证明^[15], Milirinone 能显著的降低间隙连接(GJ)数量在体外成熟过程中的下降, 因为卵丘细胞的 cAMP 或者其他的小分子物质经过 GJ 可以进入卵母细胞, 这就意味着用 Milirinone 可以提高卵母细胞细胞质成熟, 从而提高卵母细胞的后期发育能力。实验表明, PDE 调节不同卵泡细胞中 cAMP 水平的作用机制是不同的^[1]。总之, 这种选择性的 PDE 抑制剂是一有效的实验工具, 可以分别用来研究卵母细胞和卵丘细胞的成熟机制。

2) 近年来, 很多生殖生物学家从事体外培养技术的研究, 其目的是为发掘卵母细胞的发育潜能。研究者^[7, 16-18]用可逆的减数分裂抑制剂使卵母细胞阻滞于 GV 期, 从而使卵母细胞获得一定的预成熟时间, 以此模拟卵母细胞的体内获能过程。目的是给卵母细胞一定的时间用以合成并贮藏或修饰已合成的核苷酸和蛋白质, 这些蛋白质和核苷酸对于

卵母细胞的受精和后期发育是有利的。近年有研究者证明用 25 $\mu\text{mol/L}$ ROSC 抑制卵母细胞减数分裂过程是可逆的, 解除抑制后卵母细胞可以恢复减数分裂^[7]。Ponderato^[18]用不同含量的 ROSC 和 Butyrolactone I 结合的方法抑制牛卵母细胞减数分裂恢复, 再用激素诱导成熟的方法经体外受精, 成功得到完全健康的小牛。以该方法获得的囊胚移植给受体母牛后, D+8 和 D+16d 实验组与对照组相比具有正常的妊娠率。本实验也证明 cdk 抑制剂 ROSC 维持绵羊卵母细胞的减数分裂阻滞是可逆的, 解除抑制后在含有 FSH 的培养液中卵母细胞几乎全部能发育到第 2 次减数分裂中期。

已有研究表明: 用特异性的 cdk 抑制剂维持绵羊卵母细胞的减数分裂阻滞是可行的, 虽然这种方法到目前为止没有确定的证据表明能极大地提高正常后代出生的比率; 但这种方法对于牛卵母细胞成熟、受精、早期的胚胎发育而言是可行的^[18]。笔者对 Milirinone 和 ROSC 抑制成熟的绵羊卵母细胞体外受精和胚胎发育进行了初步研究, 可为绵羊卵母细胞体外培养模型和哺乳动物卵母细胞成熟的调节提供参考。

参 考 文 献

- [1] Tsafiri A, Chun S Y, Zhang R, et al. Oocyte maturation involves compartmentalization and opposing changes of cAMP levels in follicular somatic and germ cells: studies using selective phosphodiesterase inhibitors [J]. *Dev Biol*, 1996, 178:393 - 402
- [2] Rebecca E, Thomas David T, Armstrong, Robert B, et al. Differential effects of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors on bovine oocyte meiotic maturation [J]. *Dev Biol*, 2002, 244:215 - 225
- [3] Jensen J T, Schwinf 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(8):2079 - 2084
- [4] Silvia Masciarelli, Kathleen Horner, Chengyu Liu, et al. Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A-deficient mice as a model of female infertility [J]. *J Clin Invest*, 2004, 114(2):196 - 205
- [5] Kitagawa M, Okabe T, Ogino H, et al. Butyrolactone I, a selective inhibitor of cdk2 and cdc2 kinase [J]. *Oncogene*, 1993, 8:2425 - 2432
- [6] Meijer L, Borgne A, Mulner O, et al. Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor

- of the cyclin-dependent kinases cdc2 ,cdk2 and cdk5[J]. Eur J Biochem ,1997 ,243 :527 - 536
- [7] Mermillod P ,Tomanek M ,Marchal R ,et al. High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24h in culture by specific inhibition of MPF kinase activity [J]. Mol Reprod Dev , 2000 ,55 :89 - 95
- [8] Marchal R ,Tomanek M ,Terqui M ,et al. Effects of cell cycle dependent kinases inhibitor on nuclear and cytoplasmic maturation of porcine oocytes[J]. Mol Reprod Dev , 2001 ,60 :65 - 73
- [9] Kubelka M ,Motlik J ,Schultz R M ,et al. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes without influencing chromosome condensation activity [J]. Biol Reprod ,2000 ,62 :292 - 301
- [10] Homa S T. Effects of cyclic AMP on the spontaneous meiotic maturation of cumulus-free bovine oocytes cultured in chemically defined medium [J]. J Exp Zool , 1988 ,248 :222 - 231
- [11] Pavlok A ,Kanka J ,Motlik J ,et al. Culture of bovine oocytes from small antral follicles in meiosis-inhibiting medium with butyrolactone I:RNA synthesis ,nucleolar , morphology and meiotic competence[J]. Anim Reprod Sci ,2000 ,64(1 - 2) :1 - 11
- [12] Wiersma A ,Hirsch B ,Tsafriiri A ,et al. Phosphodiesterase 3 inhibitors suppress oocyte maturation and consequent pregnancy without affecting ovulation and cyclicity in rodents[J]. J Clin Invest ,1998 ,102(3) :532 - 537
- [13] Mayes M A. Effect of type 3 and type 4 phosphodiesterase inhibitors on the maintenance of bovine cumulus-enclosed oocytes in meiotic arrest [J]. Theriogenology ,2000 ,53 :459
- [14] Bilodeau-Gesels S. Effects of phosphodiesterase inhibitors on spontaneous nuclear maturation and cAMP concentrations in bovine oocytes [J]. Theriogenology , 2003 ,60(9) :1679 - 1690
- [15] Rebecca E ,Thomas David T ,Armstrong ,Robert B ,et al. Bovine cumulus cell-oocyte gap junctional communication during in vitro maturation in response to manipulation of cell-specific cyclic adenosine 3 , 5monophosphate levels[J]. Biol Reprod ,2004 ,70 :548 - 556
- [16] Rebecca Thomas , 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
- [17] Motlik J ,Pavlok A ,Lapathitis G ,et al. Impact of two-step in vitro culture system on developmental potency of oocytes[J]. Reprod Dom Anim ,2000 ,35 :267 - 271
- [18] Ponderato G ,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