

卵丘在卵母细胞成熟中的作用

岳顺利 周佳勃 严云勤*

(东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030)

摘要 卵丘是指在卵母细胞外周并与之进行代谢联系的颗粒细胞群; 卵丘对于卵母细胞成熟有极其重要的作用。主要表现在卵丘参与维持卵母细胞减数分裂阻滞, 诱导卵母细胞减数分裂恢复、支持卵母细胞细胞质的成熟。卵丘形态和卵丘扩展影响卵母细胞成熟。了解卵丘在卵母细胞成熟中的作用有助于帮助人们进一步揭示哺乳动物卵母细胞成熟的机制。

关键词 卵丘; 卵母细胞; 成熟

卵泡是雌性动物生殖的基本功能单位, 卵丘细胞作为卵泡内重要的体细胞与卵母细胞的生长发育和成熟密切相关。因而, 卵丘细胞对卵母细胞成熟的作用一直是人们研究的重要内容之一。

卵泡腔形成时, 颗粒细胞被分为两个亚群(图1): (1)卵丘细胞(CC), 指围绕并与卵母细胞进行代谢联系的颗粒细胞; (2)壁颗粒细胞(MGC), 指连接卵泡壁基膜上附着的数层颗粒细胞^[1]。高度分化的卵丘细胞的胞质突起可穿越透明带^[2], 并与卵母细胞的质膜建立缝隙连接, 形成一个功能上的整体即卵丘卵母细胞复合体(COC)^[3]。研究者认为卵丘细胞在卵母细胞成熟过程中有极其重要的作用。

1 卵丘参与保持卵母细胞减数分裂阻滞

很久以来, 人们就认为卵泡在维持减数分裂阻滞中起重要作用。1935年 Pincus 和 Enzmann 发现哺乳动物卵母细胞从卵泡抑制环境移出后会自发恢复减数分裂。有些研究认为, 来自卵泡液的某些因子

或者卵泡细胞通过旁分泌抑制卵母细胞减数分裂。

卵丘细胞和卵母细胞之间直接通讯对保持卵母细胞减数分裂阻滞十分重要。这种化学信息的通讯是由二者之间广泛存在的缝隙连接介导的。缝隙连接可允许小分子, 离子如某些代谢物、氨基酸等物质在卵母细胞和卵丘细胞之间运输, 而这些分子是卵母细胞生长和调节卵母细胞发育的所必需的。一些抑制减数分裂的物质, 例如 cAMP 和嘌呤(次黄嘌呤和腺嘌呤)^[4]也是通过缝隙连接作用于卵母细胞的。

小卵泡中, 有效刺激浓度的 cAMP 连续的运输到卵母细胞, 以保持卵母细胞减数分裂阻滞。在哺乳动物的颗粒/卵丘细胞中的 cAMP 能激发一种成熟抑制因子产生并运送到卵母细胞。它们在卵母细胞中以 cAMP 依赖的形式保持活性。这种成熟抑制因子能够提高细胞内 cAMP 水平从而有效的抑制或者延迟卵丘卵母细胞复合体(CEOs)中卵母细胞恢复减数分裂, 但对去除卵丘的卵母细胞(DOs)则无此抑制现象。在牛, CEOs 比 DOs 对颗粒细胞分泌的减数分裂抑制因子更加敏感^[5]。卵母细胞胞质成熟需要细胞内 cAMP 浓度和减数分裂阻滞都保持最优化^[6,7]。这一点只有 CEOs 才有可能做到, 进而更有利于卵母细胞的成熟, 而 DOs 则不能。因此, 卵母细胞生长和体外发育的整个培养过程^[7]都需要卵母细胞和卵丘细胞之间有效的通讯连接^[1,8]。

2 卵丘参与诱导卵母细胞恢复减数分裂

目前关于促性腺激素诱导卵母细胞恢复减数分

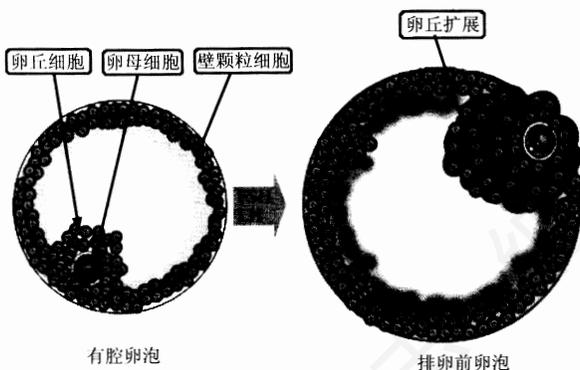


图1 卵母细胞及各种颗粒细胞间的关系(摘绘自文献[8])

收稿日期: 2005-01-04 接受日期: 2005-03-14

* 通讯作者。Tel: 0451-55190846, Fax: 0451-55190413, E-mail: yanyunqin@sohu.com

裂的机制有不同的假说：(1)通过降低细胞内卵母细胞成熟抑制因子的水平来实现；(2)通过颗粒细胞分泌的成熟促进因子克服卵泡抑制环境来实现；(3)通过遏制或者破坏卵丘和卵母细胞之间的缝隙连接来实现^[9]。

研究表明哺乳动物卵泡中的体细胞在激素诱导卵母细胞成熟的过程中起重要作用^[10]。由于卵母细胞中没有LH的受体^[11]，而在牛卵丘卵母细胞复合体卵丘细胞中含有LH受体，在大鼠的卵丘和颗粒细胞中也发现存在LH受体^[12]，因此促性腺激素的信号是通过颗粒细胞介导，传递给卵母细胞的^[13]。Su^[14]等发现LH诱导的排卵前卵丘卵母细胞复合体的成熟过程包括卵母细胞恢复减数分裂和卵丘扩展。两个过程都需要激活颗粒细胞中的促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)。抑制MAPK活性会阻止促性腺激素刺激的减数分裂恢复。研究表明只有排卵前卵泡才具有足够的LH受体来传递成熟信号进入卵母细胞，因此卵丘可能是起到沟通卵母细胞与卵泡外环境或者培养条件的作用^[15]。

根据Albertini等^[2]的报道，LH信号刺激体细胞使其产生第二信使，通过两种途径进入卵母细胞。其一，LH能直接作用于卵泡壁使壁细胞和/或颗粒细胞分泌第二信使进入卵泡液，以旁分泌的形式作用于卵母细胞；其二，第二信使通过缝隙连接使卵丘与卵母细胞直接通讯。卵丘细胞接受LH刺激后，卵丘细胞膜发生去极化，细胞内钙离子的浓度升高^[2]。由于卵丘与卵母细胞通过缝隙连接建立代谢偶联，升高的钙离子通过缝隙连接进入卵母细胞^[16,17]，卵母细胞也发生去极化并引起细胞钙离子浓度的短暂升高^[17,18]。可以说，缝隙连接实际上是卵丘细胞的一种特性并具备特殊的代谢能力，它在调节卵母细胞成熟中起重要作用^[9]。

卵母细胞成熟过程中卵丘与卵母细胞之间代谢偶联也发生变化。主要是卵丘细胞之间缝隙连接的丢失，这种变化有效地阻止了卵丘细胞内减数分裂抑制信号进入卵母细胞^[19]，从而有利于卵母细胞减数分裂的恢复。在成熟后期(卵丘扩展)，卵丘细胞与卵母细胞之间的协作变得仅局限于放射冠，外部卵丘细胞是解偶联的^[17]。这种缝隙连接下调是卵丘扩展必需的^[20]。注射荧光探针(例如荧光黄和DAPI)到猪卵母细胞中发现染料可从卵母细胞运输到放射冠细胞，并且体外成熟卵母细胞的放射冠细胞紧贴在透明带上并不扩展^[21]。在减数分裂恢复后，卵

母细胞和放射冠细胞之间缝隙连接通讯依然存在。

与之相矛盾的是，近来在猪的研究表明，卵丘扩展的结果导致MI期和MII期卵母细胞与卵丘细胞之间的缝隙连接是切断的，而在这段时间卵丘与卵丘细胞之间的缝隙连接仍保持完整^[22]。即使使用缝隙连接抑制剂，例如庚醇^[23]，或者解偶联剂，例如甘草酸(GA)^[4]也不能选择性的关闭这部分缝隙连接。这表明其他通讯方式，如旁分泌可能也起作用。或许采用剔除缝隙连接基因的小鼠模型，例如缺乏连接蛋白43的小鼠^[24]，将更有利于深入研究卵丘卵母细胞通讯方式在成熟中的作用。

3 卵丘支持卵母细胞胞质成熟

卵丘细胞可能有助于卵母细胞胞质成熟^[23]。卵母细胞胞质充分的成熟对于受精，及后续发育潜能有重要作用。胞质成熟是获得形成雄原核、单精子受精和早期胚胎发育能力所必需的^[25,26]。Fouladi Nashta等^[27]和Blondin等^[28]报道如果将牛卵丘卵母细胞复合体在保持减数分裂阻滞的生发泡期(GV期)培养一段时间，它们可能有机会获得更大的发育能力。这是因为卵丘细胞通过分泌诱导成熟的可溶性因子或者通过去除培养液中抑制胚胎发育的成分来帮助卵母细胞发育^[29]。

为了促进卵母细胞体外生长和发育，卵母细胞和卵丘细胞之间必须保持联系^[29]。兔裸卵与颗粒细胞共培养不能模拟卵丘完整的卵母细胞，而且卵丘包围的卵母细胞的减数分裂可能依赖于早期卵丘细胞内发生的转录和翻译事件。虽然卵丘对发育的有益作用的分子和细胞基础的仍然未知，但大量研究表明成熟后期的卵母细胞需要周围的卵丘提供营养和调节代谢。

牛CEOs比DOs细胞内含有更多的谷胱甘肽(GSH)^[30]。成熟卵母细胞中的GSH可以增加正常受精和发育到囊胚阶段胚胎的数量。在精子穿入后，GSH参与精子头解凝集和卵母细胞激活和精子头转变为雄原核。GSH也在维持细胞的氧化还原状态起重要作用并保护细胞防止氧化损伤^[31]。猪卵丘细胞在通过提高卵母细胞中GSH含量保护卵母细胞防止氧化诱导凋亡中起重要作用^[32]。在培养液中添加GSH前体，例如半胱氨酸或者胱氨酸，增加卵母细胞内的GSH的含量可以有效地提高牛DOs的成熟效率^[33]。卵母细胞成熟过程中卵丘细胞内部发生变化，如pH或Ca²⁺浓度改变^[23]，使卵丘细胞获得还

原胱氨酸和半胱氨酸的能力, 并有利于卵母细胞成熟时摄取半胱氨酸, 从而促进卵母细胞的胞质成熟。但卵丘细胞促进卵母细胞后续发育的机制仍然不清楚。

已知卵母细胞发育需要卵丘细胞提供丙酮酸、草酰乙酸和核苷。卵丘细胞可以将葡萄糖代谢为丙酮酸或者三羧酸循环中间产物, 这些物质能够进入卵母细胞并提高它的质量^[34]。在小鼠, DOs 与 CEOs 相比代谢葡萄糖的能力很差^[35]。葡萄糖和乳糖培养分离的小鼠卵丘细胞时也能够形成丙酮酸。近期研究发现在成熟中添加丙酮酸可使牛 DOs 成功的成熟、受精、发育^[30]。可见卵丘参与卵母细胞的能量代谢。

4 卵丘形态影响卵母细胞成熟

Fukui 等^[36]指出, 牛卵泡卵母细胞的体外成熟率, 有卵丘细胞包围者高于无卵丘细胞者, 两者差异极显著。刘喆等^[37]指出, 对绵羊而言, A 级卵母细胞的成熟率高于 B 级, B 级高于 C 级, 且三者之间差异极显著。因此, 体外培养一般选择有紧密多层卵丘细胞包裹, 细胞质均匀的卵母细胞, 而卵丘细胞部分缺损或裸露的卵母细胞被认为是闭锁卵泡中退化的卵而被抛弃。

Torner 等^[38]发现猪卵母细胞减数分裂核状态与 COCs 形态相关, 致密的 COCs, 88.9% 处于双线期; 扩展的 COCs 53.8% 到达 II 期; 裸卵, 69.2% 染色体退化。Warriach 等^[39]发现含有 3 层以上卵丘细胞的水牛卵母细胞(64.5%)的成熟率显著高于含有部分卵丘的卵母细胞和无卵丘的卵母细胞(8.6%)以及卵丘细胞共培养条件下的无卵丘卵母细胞(34.5%)的成熟率, 但是与含有 1~2 层卵丘细胞的卵母细胞的成熟率(51.4%)没有差异。无卵丘或者部分卵丘的卵母细胞的降解率显著高于其他组(13.8%~17.4%) ($P < 0.05$)。

这些结果表明卵丘完整的卵母细胞的减数分裂能力要优于裸卵(DOs)和与卵丘共培养的卵母细胞。卵丘细胞层厚度是影响卵母细胞成熟能力的一个重要因素。

5 卵丘扩展与卵母细胞成熟的关系

哺乳动物排卵前, 在促性腺激素峰促进卵母细胞完成减数分裂的过程的同时伴随着卵丘的扩展。促性腺激素刺激卵丘细胞分泌聚一种蛋白多糖基

质, 这种弹性的基质主要成分是透明质酸^[10]。扩散的卵丘细胞, 包围于黏液样的细胞基质中, 这个过程叫做卵丘黏液化(mucification)或卵丘扩展^[40]。

卵丘扩展的显著生理学意义对研究体外成熟和受精哺乳动物卵母细胞的发育潜能十分重要。卵丘的质量, 尤其是卵母细胞扩展程度常被用作选择卵母细胞用于体外受精(IVF)的标准^[41]。

卵丘扩展与卵母细胞成熟的关系引起了学者们极大关注。目前对两者关系的研究主要集中在成熟中构成卵泡的几种细胞(包括卵母细胞、卵丘细胞、壁颗粒细胞)的形态结构及合成分泌某种物质能力的变化, 以及在体外不同培养条件下和体内正常生理下变化的顺序。但是, 这方面研究的结果是不一致甚至相互矛盾的。

Eppig^[42]发现在小鼠体内卵母细胞成熟并不需要卵丘扩展。小鼠促卵丘扩展因子不依赖卵母细胞的生长也不依赖于生发泡破裂(GVBD)的发生, 因此扩展因子的作用虽然与GVBD同时发生但是不依赖于卵母细胞成熟。Prochazka 等^[43]发现猪卵丘和壁颗粒细胞在体外能够产生促卵丘扩展因子(CEEF); 卵丘细胞自分泌的 CEEF 参与调节体内和体外猪卵丘扩展。

但也有研究认为, 卵母细胞与卵丘细胞间缝隙连接的中断或减少是卵母细胞成熟的前提, 而卵丘扩展可以实现中断或减少缝隙连接的作用, 所以卵丘扩展可能是卵母细胞成熟的必要条件。一些研究结果证明卵丘扩展可能与卵母细胞核或者胞质成熟有功能关系。尤其是在培养的卵母细胞的核内物质的变化表现为与卵丘扩展或者扩展的程度^[44]有关。Qian 等^[45]的研究结果认为卵丘卵母细胞复合体的扩展程度与发育到 2 细胞胚胎, 4 细胞胚胎、桑椹胚和囊胚的比例成正相关。周佳勃等^[25]认为卵丘扩展到 3、4 级的山羊卵母细胞体外受精后桑椹胚 / 囊胚率显著高于扩展 0 和 1 级的卵母细胞。

卵丘扩展程度与卵母细胞成熟之间的关系密切: (1)卵丘扩展程度可能影响抑制减数分裂恢复的因子和促进核和胞质成熟提高卵母细胞的发育能力的同步化因子的浓度, 并间接影响核和胞质的同步成熟。(2)卵丘细胞可能产生某些有助于卵母细胞体外受精后发育能力的因子, 而且这些因子的浓度可能随着卵丘扩展程度的增大而提高。(3)当细胞和细胞之间连接丢失时, 会有更多的信号通路被激活。当卵丘扩展更显著时, 会有更多的因子通过信号传递通路进入卵母细胞。这些结果显示卵丘扩展程度

可以作为一种预测卵母细胞体外成熟和后续发育能力的参数^[45]。

总之, 卵母细胞的生长发育和成熟与其周围的卵泡细胞联系密切, 了解卵丘细胞对卵母细胞成熟的作用具有十分重要的理论与实践意义, 为人们进一步揭示哺乳动物卵母细胞成熟的机制开辟了又一有益途径。

参考文献 (References)

- [1] Gilchrist RB *et al.* *Anim Reprod Sci*, 2004, **82-83**: 431
- [2] Albertini DF *et al.* *Reproduction*, 2001, **121**: 647
- [3] Sommersberg B *et al.* *Biol Reprod*, 2000, **63**: 1661
- [4] Downs SM *Zygote*, 2001, **9**: 71
- [5] Richard FJ *et al.* *Mol Reprod Dev*, 1998, **50**: 200
- [6] Luciano AM *et al.* *Mol Reprod Dev*, 1999, **54**: 86
- [7] Motlik J *et al.* *Reprod Dom Anim*, 2000, **35**: 267
- [8] Yokoo M *et al.* *Int Rev Cytol*, 2004, **235**: 251
- [9] Tanghe S *et al.* *Mol Reprod Dev*, 2002, **61**: 414
- [10] Mattioli M. *Zygote*, 1994, **2**: 347
- [11] Baltar A *et al.* *Mol Reprod Dev*, 2000, **55**: 433
- [12] Teerds KJ *et al.* *Biol Reprod*, 1995, **52**: 500
- [13] Shimada M *et al.* *Mol Hum Reprod*, 2002, **8**: 612
- [14] Su YQ *et al.* *Dev Biol*, 2003, **263**: 126
- [15] Griffin AM *et al.* *Reprod Biomed Online*, 2004, **8**: 673
- [16] Mattioli M *et al.* *Mol Reprod Dev*, 1998, **50**: 361
- [17] Mattioli M *et al.* *Mol Cell Endocrinol*, 2000, **161**: 19
- [18] 毕春明等. *南京师大学报(自然科学版)*, 2000, **23**: 80
- [19] Isobe N *et al.* *J Reprod Fertil*, 1998, **113**: 167
- [20] Sutovsky P, *et al.* *Mol Reprod Dev*, 1995, **41**: 5621
- [21] Isobe N *et al.* *Reproduction*, 2001, **121**: 249
- [22] Suzuki H *et al.* *Biol Reprod*, 2000, **63**: 723
- [23] Mori T *et al.* *Biol Reprod*, 2000, **62**: 913
- [24] Scemes E *et al.* *J Neurosci*, 2000, **20**: 1435
- [25] Yamauchi N *et al.* *Biol Reprod*, 1999, **61**: 828
- [26] 周佳勃等. *动物学报*, 2004, **50**: 216
- [27] Fouladi Nashta AA *et al.* *Biol Reprod*, 1998, **59**: 255
- [28] Blondin P *Theriogenology*, 1997, **47**: 1061
- [29] Hashimoto S *et al.* *Theriogenology*, 1998, **50**: 334
- [30] Geshi M *et al.* *Biol Reprod*, 2000, **63**: 1730
- [31] Lim JM *et al.* *Theriogenology*, 1996, **46**: 429
- [32] Tatemoto H *et al.* *Biol Reprod*, 2000, **63**: 805
- [33] de Matos DG *et al.* *Biol Reprod*, 1997, **57**: 1420
- [34] Downs SM *et al.* *Mol Reprod Dev*, 2003, **66**: 90
- [35] Downs SM *et al.* *Biol Reprod*, 1999, **60**: 1446
- [36] Fukui Y *et al.* *Biol Reprod*, 1980, **22**: 669
- [37] 刘喆等. *内蒙古大学学报(自然科学版)*, 2000, **31**: 102
- [38] Torner H *et al.* *Theriogenology*, 1998, **50**: 39
- [39] Warriach HM *et al.* *J Vet Sci*, 2004, **5**: 247
- [40] Salustri A *et al.* *Hum Reprod Update*, 1999, **5**: 293
- [41] Chen L *et al.* *Mol Reprod Dev*, 1993, **34**: 87
- [42] Eppig JJ. *Dev Biol*, 1982, **89**: 268
- [43] Prochazka R *et al.* *Mol Reprod Dev*, 1998, **49**: 141
- [44] Suss U *et al.* *Biol Reprod*, 1988, **38**: 871
- [45] Qian Y *et al.* *J Reprod Dev*, 2003, **49**: 167

The Role of Cumulus Oophorus in Oocyte Maturation

Shun-Li Yue, Jia-Bo Zhou, Yun-Yin Yan*

(College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract Cumulus oophorus is a group of closely associated granulose cells, which surrounds the oocyte. Cumulus oophorus plays a crucial role in oocyte maturation, including keeping the oocyte under meiotic arrest, participating in the induction of meiotic resumption, and supporting cytoplasmic maturation. Cumulus oophorus morphology and cumulus cell expansion influence the processes of oocyte maturation. Understanding the role of cumulus oophorus in oocyte maturation will enable us to reveal the mechanism of mammal oocyte maturation.

Key words cumulus oophorus; oocyte; maturation

Received: January 4, 2005 Accepted: March 14, 2005

*Corresponding author. Tel: 86-451-55190846, Fax: 86-451-55190413, E-mail: yanyunqin@sohu.com