

# 卵母细胞成熟过程中线粒体的变化

刘 珊 李 媛 陈子江\*

(山东大学山东省立医院生殖医学中心, 济南 250021)

**摘要** 卵子成熟是一个复杂的过程, 细胞核成熟和细胞质成熟必须和谐地统一在一起, 才能保证卵子的正常受精和进一步的发育。作为细胞质内最重要的细胞器, 线粒体的分布在卵子成熟过程中出现了显著变化。同时其产生的 ATP 是卵子、受精卵以及胚胎主要的能量来源。因此, 对卵子成熟过程中线粒体的分布和功能变化的研究, 有利于进一步了解生殖生理, 并为解决辅助生育技术中所面临的难题提供新的思路。

**关键词** 线粒体; 卵子成熟; 体外成熟培养; ATP

卵子成熟是一个复杂的过程, 卵子必须经历一系列细胞核和细胞质的变化来具备受精和进一步发育的能力。核成熟过程包括生发泡(germinal vesicle, GV)破裂和染色体的重新组织和聚集, 同时排出第一极体。但对细胞质成熟程度一直缺乏有效的观察和评价指标。线粒体是细胞质中含量最丰富的细胞器, 其结构和分布在卵子发育成熟过程中出现了显著变化, 同时其产生的 ATP 是卵子、受精卵以及胚胎主要的能量来源。因此有研究推测, 线粒体的功能成熟是细胞质成熟的一个重要指标, 缺乏线粒体的重新分布是细胞质未成熟和低发育能力的标志。

## 1 人线粒体

光镜所见的线粒体为粒状、短杆状或线状, 直径为 0.1~0.5  $\mu\text{m}$ , 长 1~2  $\mu\text{m}$ 。在电子显微镜下, 线粒体由两层高度特化的单位膜围成, 其中内膜内的空间为基质腔, 内膜与外膜之间的空间为膜间腔。线粒体的化学组成主要为脂类和蛋白质, 其中蛋白质含量占线粒体干重的 65%~70%。已确认线粒体中含有 140 多种酶, 组成几十种不同的酶系。与线粒体功能相关的蛋白质和酶系主要存在于内膜和基质腔中。依靠这些酶的催化, 将细胞内的各种供能物质氧化后释放出来, 为细胞的活动提供能量。除此以外, 线粒体在凋亡的调节、钙稳态、Fe-S 蛋白合成、嘧啶和血红素合成中均起重要作用。人线粒体具有自身独特的 DNA 分子和完整的遗传信息传递与表达系统。线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 在进化过程中具有高度的保守性, 人线粒体 DNA 全长为 16 569 bp, 含有 37 个基因, 编

码 2 种 rRNA、22 种 tRNA, 也能转录成 mRNA。但这种 mRNA 只编码线粒体内膜呼吸酶复合体的 6 个亚单位、细胞色素 c 氧化酶的 3 个亚单位、ATP 酶 2 个亚单位和细胞色素 b 亚单位。内膜上其余的蛋白质、基质中以及外膜的蛋白质, 都是由核基因编码的。大多数人类体细胞中含有 1 000 个线粒体, 每个线粒体含有 2~10 个拷贝的 mtDNA。在成熟人卵子中 mtDNA 的拷贝数更多, 约为 100 000 个, 但每个线粒体中只含有一个 mtDNA 拷贝。

## 2 线粒体的观察与染色方法

将线粒体染色后, 可用共聚焦显微镜对其进行定位观察。常用的线粒体特异性染料有 JC-1<sup>[1,2]</sup>, 罗丹明(rhodamine)-123<sup>[3,4]</sup>, Mito Tracker 系列<sup>[5-9]</sup>。前两者是跨膜电位依赖性的染料, 只可用于活性线粒体的染色。一旦卵子被固定, 跨膜电位丧失后, 就无法使线粒体着色。这种性质限制了其在那些必须对卵子进行固定和含有某些影响线粒体功能状态的物质的实验中的应用。成熟和未成熟卵子均可用 Mito Tracker 染色, 这种染料不受线粒体跨膜电位的影响, 一旦结合到线粒体脂质上即可被激发出荧光, 在固定后仍然保持良好, 因此是一种研究线粒体分布的重要工具。将卵子加入含有 100 nmol/L Mito Tracker Green FM 的改良人输卵管液(modified human tubular fluid, mHTF)中 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5%CO<sub>2</sub> 培养 30 min 即可染色。

收稿日期: 2006-05-08 接受日期: 2006-10-16

\* 通讯作者。Tel: 0531-85187856, Fax: 0531-87068226, E-mail:

liushan821009@chinaren.com

### 3 卵子成熟前后线粒体位置的变化

卵子成熟包括细胞核成熟和细胞质成熟, 分别包括染色体和细胞器的重新分布<sup>[10]</sup>, 两者是和谐的统一在一起的, 以此来保证胚胎的正常发育。其中, 线粒体的分布和代谢活性是细胞质成熟和减数分裂恢复的重要特征<sup>[11]</sup>。Stojkovic 等<sup>[12]</sup>研究了不同形态的牛卵子在体外成熟培养(*in vitro* maturation, IVM)前后的线粒体分布, 认为未成熟卵与成熟卵在线粒体分布上有显著的区别。IVM 之前, 线粒体簇较小, 多分布于细胞质的周边; IVM 以后, 线粒体簇变大, 着色变深, 且在细胞质中央也有线粒体的分布。

在猪的 GV 期卵子中, 活性线粒体聚集于细胞质周边部位。在体外成熟至第一次减数分裂中期或后期时, 则聚集于核周区域。在绝大多数体外成熟的卵子中, 线粒体趋向于细胞质中央分布, 极少部分甚至达到了细胞质正中央。GV 期卵子中胞膜下的深染区域在第二次减数分裂中期(*metaphase II*, M II)的卵子中不再明显。文献报道, 在猪卵子成熟过程中, 线粒体向细胞质中央的移位始于 IVM 16 h 左右, 即生发泡破裂(*germinal vesicle breakdown*, GVBD)之前, 在 IVM 36 h 时已完全停止。IVM 36 h 与 IVM 46 h 之间没有观察到线粒体的移位<sup>[6]</sup>。与体外成熟的卵子相比, 体内成熟的卵子最显著的特征是线粒体分布于整个细胞质中, 尽管在大部分卵子中, 细胞质周边的线粒体比中央区域更为聚集。体外成熟的卵子中, 细胞质中央区域缺乏线粒体的分布可能是由于体外培养条件不足引起的。在体内成熟和体外成熟的卵子中均观察到线粒体在第一极体的浓染。通过对体内成熟的兔卵子进行荧光染色, 发现活性线粒体集中分布于第一极体中<sup>[12]</sup>。

### 4 卵子成熟前后线粒体位置变化的机制

在未成熟卵子中, 线粒体的周边分布与卵子周边部分的高能量需要有关, 因为此期的卵子需要颗粒细胞的支持, 卵子和颗粒细胞之间的缝隙连接将其紧密连接起来。线粒体在核周区域的聚集可能与核的合成作用无关, 因为生长中的卵子有较高的 RNA 合成, 但充分生长的卵子则停止了 rRNA 的合成。在减数分裂开始后, 没有观察到 RNA 的合成<sup>[13]</sup>。线粒体的核周聚集可能与 GVBD 有关。

一种可能性是这种特殊的分布方式为 GVBD 提供能量。对人合子中线粒体的分布与 ATP 含量的研

究证明, 线粒体数目的减少与 ATP 产生能力降低有关<sup>[14]</sup>。但也有研究认为, 在胚胎早期发育过程中, 线粒体对 ATP 浓度的贡献可能较小<sup>[15]</sup>。另外, Downs 等<sup>[16]</sup>认为, 在小鼠卵子中, 葡萄糖介导的对减数分裂的刺激作用的机制并不是产生 ATP。同时, 在体外培养 44 h 后仍停滞在 GV 期的卵子中, 也发现线粒体聚集在 GV 周围, 提示线粒体在 GV 区的聚集并不足以引起 GVBD。另一种可能性是线粒体的核周聚集可能通过调节局部  $Ca^{2+}$  浓度在 GVBD 中发挥作用。在猪的卵子中, 内源性细胞质内  $Ca^{2+}$  的增加是 GVBD 的前提<sup>[17]</sup>。Lane 等<sup>[18]</sup>对大鼠胚胎的研究认为线粒体的分布与胞内稳态的调节有关。

GVBD 以后, 在中期 I 和后期 I 的卵子中, 线粒体仍分布于核周区域, 可能与减数分裂过程中纺锤体聚集、线粒体浓集和移动以及极体排出需要较多能量有关。小鼠卵子成熟过程中, 线粒体的核周聚集是细胞质成熟的一部分<sup>[11]</sup>。Nishi 等<sup>[6]</sup>对小鼠卵子的研究证明, 缺乏线粒体在核周区域的聚集导致了卵子成熟阻滞。核周区域线粒体的浓染或者是由于线粒体的定位或者是由于原位线粒体的活化引起的。

线粒体的移位是由微管介导的。发育潜能较低的卵子缺乏线粒体的重新分布可能并非是由于线粒体不能沿微管迁移所致, 而是由于这些卵子的细胞质中未能形成微管网络结构。与核相连的微管的正常形成保证了减数分裂过程中染色体的正确分离, 但由于胞质中缺乏微管网络结构, 未能实现线粒体的重新分布。另外, 最新的研究证明, 雌激素受体  $\beta$  定位于线粒体上<sup>[19]</sup>, 提示人们线粒体的这种特殊的分布对于卵子对  $17\beta$ -雌二醇的反应可能是必需的, 后者在排卵前卵泡中有较高的浓度。

### 5 线粒体分布变化与卵子发育潜能的关系

评价一个体外成熟体系好坏与否的最可靠的指标是在其中培养的胚胎发育成胎儿的能力, 但由于现实和伦理的原因, 最常用的评价指标仍然是卵子受精后的囊胚形成率。许多研究均提示: 卵子质量是影响囊胚形成率的最关键的因素<sup>[20]</sup>。但卵子质量的本质仍不太清楚, 包括许多方面的因素<sup>[21]</sup>。有研究认为细胞质区室化在卵子细胞核和细胞质同步成熟方面起重要作用<sup>[22]</sup>。其中线粒体的分布是细胞质区室化的一个较容易观察的指标。Brevini 等<sup>[7]</sup>研究了调控猪卵母细胞胞质成熟和胚胎发育能力的机

制, 他们认为在 IVM 培养基中添加卵泡液可达到细胞核和细胞质的同步成熟, 而在未添加卵泡液的 IVM 培养基中培养的卵子, 其核质成熟不同步。在这两种培养基中体外成熟的卵子, 成熟率无差异, 但就孤雌激活后发育成囊胚的比率而言, 前者的发育潜能明显高于后者。据此分为发育潜能较高的卵子和较低的卵子两组。线粒体在大部分未成熟卵子的细胞质中呈现周边分布。IVM 以后, 发育潜能较高的卵子的线粒体在细胞质中多呈均匀分布, 但在大部分发育潜能较低的卵子中, 线粒体仍然维持周边分布, 即 IVM 过程中未发生线粒体的重新分布。此结果提示, 缺乏线粒体在胞质中的重新分布是胞质未成熟的标志, 与较低的卵子发育潜能密切相关。

## 6 卵子成熟前后ATP含量的变化

在卵子成熟过程中, 线粒体的成熟、重新分布、ATP 的产生和能量聚积对卵子活化、受精和进一步发育过程至关重要<sup>[23]</sup>。异常的线粒体分布可能会降低氧化磷酸化能力, 从而使活性氧化剂的产生能力降低, 由此导致的氧化应激会损伤线粒体的功能或者启动凋亡<sup>[24]</sup>。卵子来源的线粒体对早期胚胎发育的重要作用已被小鼠中线粒体转录因子 A 基因的失活实验所证实<sup>[25]</sup>。该基因对线粒体 DNA 的转录、复制和线粒体的生物合成是必需的。Calarco 等<sup>[11]</sup>认为, 线粒体的重新分布与其代谢活性增加有关。Stojkovic 等<sup>[5]</sup>的研究证实了这一点, 他认为, 卵子 ATP 的含量受卵-冠-丘复合物(corona oocyte complexes, COC)形态和成熟程度的影响, 但与是否排出第一极体无关, 即线粒体的代谢活性与细胞核成熟无关。胞浆均一, 卵丘完整、紧密的卵子中 ATP 的含量明显高于胞浆不均一、透明带裸露的卵子。牛卵子中 ATP 的含量在 IVM 以后明显增加, 猪卵子体外成熟过程中, 线粒体的氧化活性也显著增加<sup>[26]</sup>。但体内成熟和体外成熟的卵子中 ATP 的含量没有显著性差异。与此相反, 在小鼠卵子成熟过程中则没有观察到 ATP 含量的增加<sup>[27]</sup>。

## 7 小结

在人类辅助生殖领域, 对未成熟卵进行体外成

熟培养具有重要的意义。因其可节省医疗费用和就医时间, 为卵巢去势患者保存生育力和建立卵子库, 对多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)患者来说, 还可免除超促排卵造成卵巢过度刺激综合征(ovarian hyperstimulation syndrome, OHSS)的危险。因此目前是人们研究的热点。在体内自然发育的卵子中, 细胞核和细胞质的成熟是高度统一的, 但是在体外成熟培养中, 细胞核与细胞质的成熟却不能完全同步, 大多数体外成熟的失败与细胞质方面的因素有关。第一极体的排出标志着细胞核的成熟, 但目前尚缺乏一个公认的指标来评价细胞质的成熟程度。线粒体作为细胞质内最重要的细胞器和能源基地, 在卵子的成熟和进一步发育过程中发挥着重要作用。掌握线粒体在卵子体外成熟前后的分布和功能变化, 有助于揭示细胞质成熟的机制, 从而进一步了解生殖生理, 促进人类辅助生殖技术的发展。

## 参考文献(References)

- [1] Tarazona AM *et al. Reprod Domest Anim*, 2006, **41**: 5
- [2] Thouas GA *et al. Biol Reprod*, 2005, **73**: 366
- [3] Rho GJ *et al. Mol Reprod Dev*, 2002, **63**: 464
- [4] Thouas GA *et al. Biol Reprod*, 2004, **71**: 1936
- [5] Stojkovic M *et al. Biol Reprod*, 2001, **64**: 904
- [6] Nishi Y *et al. J Nippon Med Sch*, 2003, **70**: 408
- [7] Brevini TA *et al. Biol Reprod*, 2005, **72**: 1218
- [8] Velilla E *et al. Mol Reprod Dev*, 2006, **73**: 617
- [9] Fulka H. *Reproduction*, 2004, **127**: 195
- [10] Bavister BD. *Theriogenology*, 2000, **53**: 619
- [11] Calarco PG. *Dev Genet*, 1995, **16**: 36
- [12] 韩之明等. *北京师范大学学报(自然科学版)*, 2002, **38**: 113
- [13] Sun QY *et al. Dev Reprod Biol*, 1996, **5**: 24
- [14] Van Blerkom J *et al. Hum Reprod*, 2000, **15**: 2621
- [15] Trimarchi JR *et al. Biol Reprod*, 2000, **62**: 1866
- [16] Downs SM *et al. Dev Biol*, 1994, **162**: 154
- [17] Kaufman ML *et al. J Exp Zool*, 1993, **265**: 69
- [18] Lane M *et al. Biol Reprod*, 1998, **59**: 1000
- [19] Yang SH *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**: 4130
- [20] Sirard MA. *Theriogenology*, 2001, **55**: 1241
- [21] Duranthon V *et al. Theriogenology*, 2001, **55**: 1277
- [22] Combelles CM *et al. Dev Biol*, 2001, **239**: 281
- [23] Thompson JG *et al. J Reprod Fertil*, 2000, **118**: 47
- [24] Dumollard R *et al. Development*, 2004, **131**: 3057
- [25] Larsson NG *et al. Nat Genet*, 1998, **18**: 231
- [26] Torner H *et al. Theriogenology*, 2004, **61**: 1675
- [27] Brad AM *et al. Mol Reprod Dev*, 2003, **64**: 492

## Changes of Mitochondria during the Maturation of Oocytes

Shan Liu, Yuan Li, Zi-Jiang Chen\*

(Reproductive Medical Center of Shandong Provincial Hospital, Shandong University, Jinan 250021, China)

**Abstract** The maturation of oocyte is a complex progress. The nuclear and cytoplasmic maturation should be well-orchestrated in order to guarantee normal fertilization and further development. Mitochondria are the most important organelles in the cytoplasm and the distribution of which changes dramatically during maturation of oocyte. Meanwhile, the ATP generated by mitochondria is the main resource of energy for oocyte, zygote and embryo. Therefore, researches on the changes of distribution and function of mitochondria during maturation of oocyte will not only be helpful to understand reproductive physiology, but also provide new insights to resolve the problems to be faced with assisted reproductive technology.

**Key words** mitochondria; maturation of oocyte; *in vitro* maturation; ATP

Received: May 8, 2006 Accepted: October 16, 2006

\*Corresponding author. Tel: 86-531-85187856, Fax: 86-531-87068226, E-mail: liushan821009@chinaren.com

### 中华医学会生殖医学分会和中国动物学会生殖生物学分会

#### 2007(联合)年会征文通知

由中华医学会生殖医学分会和中国动物学会生殖生物学分会联合主办的 2007(联合)年会, 定于 2007 年 4 月在浙江省杭州市召开。此次会议由浙江大学主办, 复旦大学、南京医科大学、上海交通大学协办。现将会议征文通知如下: (1) 征文内容包括生殖生物学基础研究; 男性生殖医学的基础和临床研究; 女性生殖医学的基础和临床研究; 男、女性生殖内分泌学; 生殖医学的伦理和心理; 生殖医学的法规和政策管理等。(2) 征文要求: 论文全文(限 4 000 字以内)及 800 字以内论文摘要, 论文题目要求中英文。具体可登陆会议网站([www.csrmeeting.org](http://www.csrmeeting.org))注册后通过“网上征文”项录入。(3) 截止日期: 2006 年 12 月 31 日。(4) 参加会议者可授予国家继续教育 I 类学分。(5) 会务秘书处联系方式: 地址: 浙江省杭州市学士路 2 号浙江大学医学院附属妇产科医院, 邮政编码: 310006。联系人: 张艳玲。电话: 0571-87061501-1812。传真: 0571-87061878。E-mail: [ylzn@zju.edu.cn](mailto:ylzn@zju.edu.cn)。