

FSH、EGF、胰岛素促进小鼠卵母细胞 体外减数分裂恢复机制的研究[#]

李朝军 范必勤* 王金璞** 张祖暄***

(南京师范大学生物系 210097 *江苏省农科院农业部农业生物技术实验室

南京大学配位化学国家重点实验室 *南京大学医学院)

哺乳类动物卵母细胞的减数分裂过程中存在两次停滞现象。当卵母细胞生长至一定程度时,在卵泡刺激素(FSH)和促黄体生成素(LH)的共同作用下,打破第一次减数分裂的停滞状态,生发泡破裂(Germinal Vesicle Breakdown, GVBD)。在此过程中卵母细胞外的滤泡细胞(卵丘细胞和卵巢颗粒细胞)起调节作用,将外界信号转换传递给卵母细胞,导致卵母细胞减数分裂的恢复。

FSH是一种糖蛋白激素,与其他激素和生长因子如表皮生长因子(EGF)^[1,2],胰岛素样生长因子(IGF)^[3]一样通过作用于靶细胞膜上的受体,影响滤泡细胞的生长代谢,进而控制卵母细胞减数分裂的启动。卵母细胞减数分裂的调控还受许多细胞内因素的影响,如第二信使cAMP和Ca²⁺水平的变化等等^[4-6]。本文采用卵母细胞和卵巢颗粒细胞体外培养的方法,对FSH、EGF和胰岛素影响小鼠卵母细胞减数分裂的重新启动的机制进行比较研究。

材料与方 法

一、实验材料

采用22—24天龄的昆明系小鼠。

试剂:胰岛素,次黄嘌呤,为Sigma产品;Fura-2/AM为Molecular Probe公司产品;EGF:南京大学生物系叶世民先生赠送;FSH:宁波激素制品厂;¹²⁵I-cAMP放免试剂盒:上海中医学院同位素室。

试验仪器:AR-CM-MIC阳离子测试系统,美国Spex公司生产;1470 W 12 ARO γ 计数器;Beckman产品。

二、卵母细胞的获取及卵巢颗粒细胞的培养

方法详见前文^[1]。卵巢颗粒细胞培养液为

DMEM+10%小牛血清。为避免血清中不明因子的影响,培养卵母细胞时培养液中加入牛血清白蛋白(BSA),并加入次黄嘌呤(4 mmol/L)以抑制卵母细胞的自发自成熟。以卵母细胞的生发泡破裂(GVBD)为减数分裂重新启动的标志。

三、小鼠卵母细胞的减数分裂的重新恢复

EGF、胰岛素、FSH按最佳作用浓度到加入含4 mmol/l次黄嘌呤的培养液中。自然状态下小鼠卵母细胞一般在2—3 h内发生GVBD,所以分别观察培养3 h和14—16 h的卵母细胞发生GVBD的百分率。

四、培养卵丘细胞中Ca²⁺水平的测定

方法同前文^[1]。以Ca²⁺指示剂Fura-2/AM作为荧光探针,使用AR-CM-MIC阳离子测试系统检测单个培养卵丘细胞内Ca²⁺水平的变化。以激发波长340 nm与380 nm的荧光强度的比值表示钙离子的相对浓度。

五、卵巢颗粒细胞内cAMP水平的测定

培养于48孔板中的颗粒细胞在2—3天内铺满孔底。实验前将培养液换成不含血清而含4 mg/ml BSA的培养液,培养24 h以上,以提高颗粒细胞对外界刺激的敏感性。加入药物培养24 h后弃去培养液,低渗后反复冻融裂解细胞,放射免疫法测定其中cAMP的含量。

结 果

一、EGF、胰岛素和FSH促进小鼠卵母细胞减数分裂的重新启动

EGF、胰岛素和FSH的最适作用浓度分别为1 μ g/ml、100 ng/ml和2 IU/ml。EGF、胰岛素和FSH均可拮抗培养液中次黄嘌呤对卵母细胞减数分裂的抑制,促进卵丘细胞-卵

* 本研究受江苏省自然科学基金资助

母细胞复合体(COC)减数分裂的恢复,但是对无卵丘细胞的裸卵无作用。EGF和胰岛素在3h时均几乎已达到其最大效果,而FSH的作用存在滞后现象,即作用3h时,FSH仅达到其最大作用效果(14h)的约48%(45%/94%),但FSH作用后卵丘细胞扩散,从而使卵母细胞和卵丘细胞的联系破坏,而EGF和胰岛素作用后卵丘细胞不发生扩张现象。可能FSH对卵母细胞的作用机制不同与EGF和胰岛素。

二、卵丘细胞内Ca²⁺的变化

已报道EGF可使卵丘细胞内游离Ca²⁺升

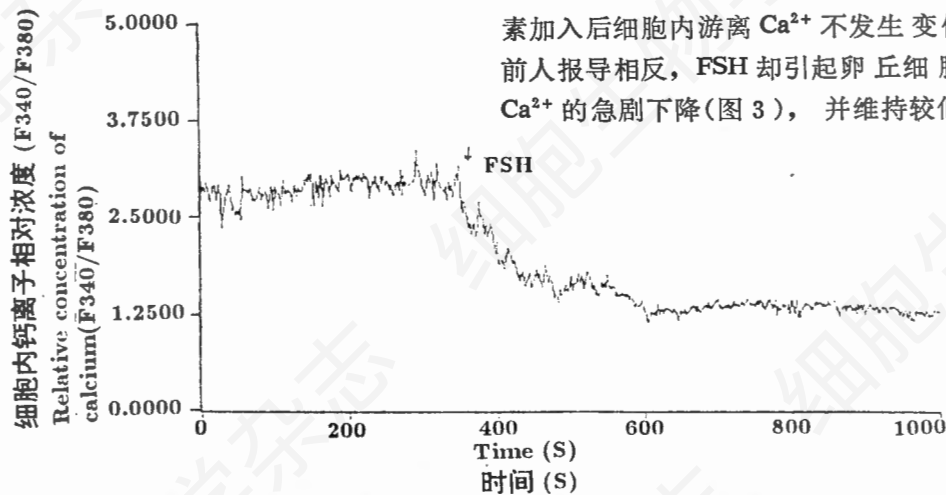


图2 胰岛素对培养的单个卵丘细胞内Ca²⁺水平的影响

三、卵母细胞和颗粒细胞内cAMP水平的变化

GVBD发生时,卵母细胞内的cAMP浓度下降,从而启动了卵母细胞减数分裂,这个过程受卵丘细胞和颗粒细胞的调节。在卵母细胞与卵丘细胞以及卵丘细胞与卵巢颗粒细胞之间存在细胞连接,可进行物质和信息的交流。由于FSH,EGF和胰岛素又只对COC的GVBD起促进作用,而对DO无影响,因此又进一步测定了EGF和胰岛素对颗粒细胞cAMP水平的影响。如表1所示,EGF和胰岛素均可导致颗粒细胞内cAMP水平下降,可能进而通过影响卵丘细胞而使卵母细胞内cAMP水平降

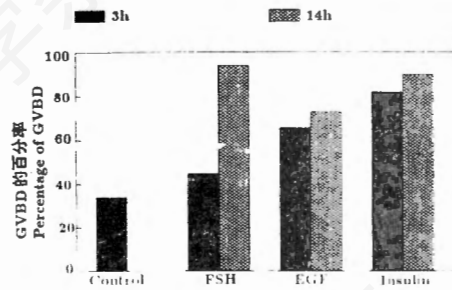


图1 FSH、EGF和胰岛素对小鼠卵母细胞(COC)减数分裂启动的影响。对照中加入4mmol/l次黄嘌呤

高并保持较高水平^[1]。结果表明胰岛素对卵丘细胞内的游离Ca²⁺水平无影响(图2),胰岛素加入后细胞内游离Ca²⁺不发生变化。而与前人报导相反,FSH却引起卵丘细胞内引起Ca²⁺的急剧下降(图3),并维持较低水平。

低。

表1 EGF和胰岛素对卵巢颗粒细胞cAMP水平的影响

处理 Treatment	cAMP水平 (pmol/well) cAMP level (pmol/well)
Control	1252±55
EGF	366±35*
胰岛素	336±4*

*P<0.01,与对照存在显著差异

讨 论

在哺乳动物卵母细胞的减数分裂过程中,细胞信号的传递是至关重要的。一些激素和生

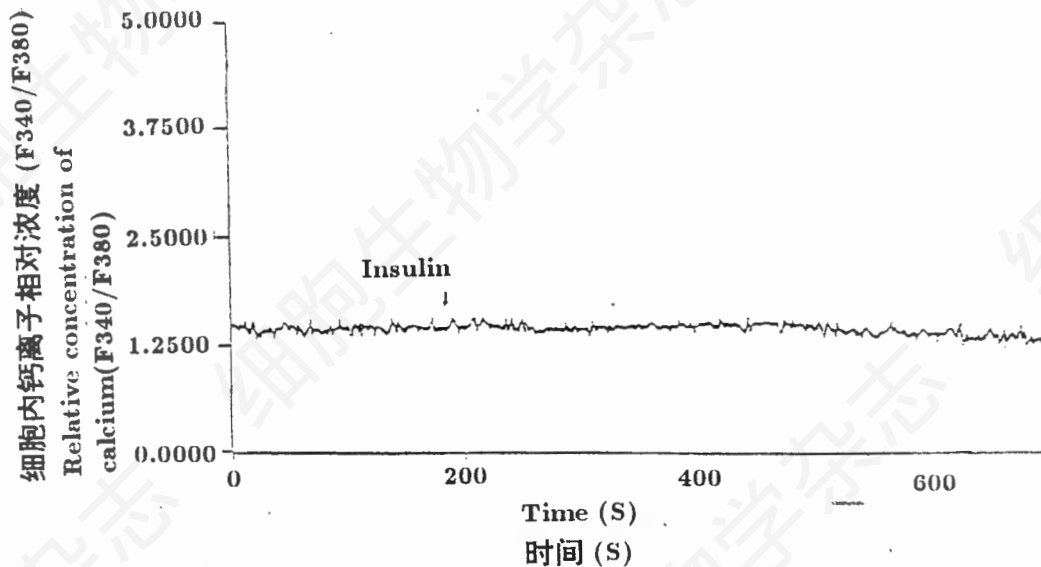


图3 FSH对培养的单卵丘细胞内 Ca^{2+} 水平的影响

长因子与卵巢颗粒细胞膜上的受体结合,引起细胞内第二信使的变化,将信号传递给卵丘细胞,并可能通过旁分泌的形式卵母细胞,也可能通过卵丘细胞与卵母细胞之间的细胞连接,将信号传递给卵母细胞,影响卵母细胞的减数分裂恢复^[7]。如EGF与颗粒细胞膜上的受体结合,诱导单层培养的大鼠颗粒细胞分泌孕酮^[8]。EGF和孕酮均引起卵丘细胞内游离 Ca^{2+} 水平的变化,并通过与卵母细胞之间的细胞连接,诱使GVBD的发生^[9];血管紧张素-Ⅱ与爪蟾滤泡细胞表面受体结合引起滤泡细胞内游离 Ca^{2+} 的变化,并通过与卵母细胞之间的间隙连接卵母细胞的成熟^[10,11]。

大量研究表明,FSH和胰岛素的生理作用主要是通过细胞内cAMP介导的。FSH也可引起猪单个卵巢颗粒细胞内游离 Ca^{2+} 的升高^[12],但是 Ca^{2+} 变化的时间模式与通过细胞内磷酸肌醇途径引起 Ca^{2+} 变化的模式不同,是一个相对比较慢的过程,一般最大反应时间为5—10 min,而其他与磷酸肌醇途径相关的模式如GnRH和血管紧张素-Ⅱ等诱发的时间相对较短,一般约为几分钟,然后基础值升高并持续一段时间^[13]。所以FSH可能是通过细胞内 Ca^{2+} 和cAMP两条影响减数分裂

的途径,相对独立又共同作用引起减数分裂的恢复。

但是FSH对小鼠卵丘细胞内游离 Ca^{2+} 水平的影响却不同于猪的情况,FSH没有引起 Ca^{2+} 水平的升高,反而导致 Ca^{2+} 的下降。有研究表明FSH可升高颗粒细胞的cAMP水平^[14],因此有可能通过细胞连接使卵母细胞维持较高的cAMP水平,抑制了减数分裂的恢复。但由于FSH使卵丘细胞扩散,使卵丘细胞内的信号变化不能传递入卵母细胞,最终使卵母细胞的减数分裂重新恢复,这可能就导致FSH的作用迟缓的原因。

胰岛素可引起卵巢颗粒细胞内cAMP水平下降,但是对颗粒细胞内的 Ca^{2+} 水平并无影响。EGF同样也引起培养卵巢颗粒细胞cAMP水平的降低。由于EGF和胰岛素作用时不引起卵丘细胞的扩散,这些第二信使可通过细胞连接促使卵母细胞减数分裂的重新恢复。所以,虽然FSH、EGF和胰岛素均可导致小鼠卵母细胞减数分裂的启动,作用机制不同:EGF可引起卵巢颗粒细胞内 Ca^{2+} 的升高和cAMP水平的下降;FSH可引起 Ca^{2+} 的降低,但可使卵丘细胞扩散,解除卵丘细胞对卵母细胞恢复减数分裂的抑制作用;而胰岛素只引起细胞

内 cAMP 的降低, 不影响 Ca^{2+} 的水平。

摘 要

FSH、EGF 和胰岛素均对体外培养的小鼠卵母细胞的减数分裂的恢复起促进作用, 而 FSH 的促进作用滞后, 但作用后使卵丘细胞扩散。三者的促进作用似受卵巢颗粒细胞内游离钙和 cAMP 的调节。EGF 和胰岛素可使培养的颗粒细胞内的 cAMP 水平降低; 同时 FSH 使单个卵丘细胞内的游离 Ca^{2+} 水平降低, 而胰岛素无影响。所以 FSH、EGF 和胰岛素诱发卵母细胞成熟的机制不同: EGF 通过细胞内 Ca^{2+} 的升高和 cAMP 水平的下降促使卵母细胞的减数分裂恢复; FSH 降低卵丘细胞内 Ca^{2+} 的水平, 但由于卵丘细胞与卵母细胞之间的联系被打断, 最终使 GVBD 发生; 而胰岛素的作用只涉及胞内 cAMP 的变化。

关键词: EGF FSH 胰岛素 减数分裂
恢复 Ca^{2+} cAMP

参 考 文 献

- [1] 李朝军等, 1995, 实验生物学报, 28 (2): 131—136.
- [2] Gomez, E. et al., 1993, *Human Reprod.*, 8 (5): 691—694.
- [3] Gorospe, W. C. et al., 1992, *Endocrinology*, 130 (3): 1750—1752.
- [4] Downs, S. M. 1993, *Theriogenology*, 39: 65—79.
- [5] 李朝军等, 1994, 实验生物学报, 27 (4): 457—462.
- [6] Li, C. J. et al., 1994, *Metal Ions in Biol. and Medicine.*, P. Collery Eds, Vol. 3, pp 411—415.
- [7] Berridge, M. J. 1993, *Nature*, 361: 315—325.
- [8] 赵明等, 1993, 生理学报, 45 (3): 207—214.
- [9] Li, C. J. et al., 1995, *Arch. STD/HIV Res.*, 9: 19—27.
- [10] Sandbery, K. et al., 1990, *Science*, 249: 298—301.
- [11] Sandbery, K. et al., 1992, *J. Cell Biol.*, 117: 157—167.
- [12] Apfeldorf, W. J., J. Rasmussen. 1988, *Cell Calcium*, 9: 71—80.
- [13] Garcia, R. et al., 1982, *J. Steroid Biochem.*, 16: 317.
- [14] Hsueh A. J. W. et al., 1984, *Endocr Rev.*, 5: 76—127.

A PRELIMINARY STUDY ON THE MECHANISM OF EGF, FSH, INSULIN'S EFFECT ON THE MEIOTIC DIVISION OF MOUSE OOCYTES

LI Chao Jun et al.

(Biology Department of Nanjing Normal University, Nanjing, 210097)

ABSTRACT

Mouse oocyte arrested GV stage were used to study the action of FSH, EGF and Insulin on the meiotic resumption. FSH, EGF, and insulin could trigger the GVBD of mouse oocyte in vitro. But the accelerating effect of FSH lagged behind other two factors, while cumulus cells adhering to oocyte expanded after being exposed to FSH. Their action seem to be modulated by cytosolic free Ca^{2+} or cAMP level in granulosa cells. EGF and insulin decreased the cAMP level in granulosa cells. The cytosolic free Ca^{2+} in single cumulus cell dropped below to normal level when it was exposed to FSH, while insulin had no effect on the Ca^{2+} level in cumulus cell. So the mechanisms of FSH, EGF and insulin inducing the maturation of oocytes were different, EGF induced GVBD through both cAMP descent and Ca^{2+} increase pathways. Despite of the decreasing of the Ca^{2+} level in cumulus cells, the relation between cumulus cells and oocyte was blocked because of the expanding of cumulus cells, GVBD could also occur after long exposure to FSH. But the effect of FSH was not so great as that of EGF and insulin. While the effect of insulin was only related with cAMP pathway in granulosa cell and cumulus cell.

Key words: EGF Insulin FSH Meiotic resumption Ca^{2+} cAMP