

一氧化氮供体硝普钠对猪腔前卵泡体外培养的影响

权青^{1a,1b}, 陶勇^{1a*}, 章孝荣^{1a*}, 姚桂东², 汪金菊^{1a}

(1.安徽农业大学 a.动物科技学院; b.经济技术学院, 安徽 合肥, 230036; 2.中国科学技术大学 生命科学院, 安徽 合肥, 230022)

摘 要: 研究在培养液中添加不同浓度(0.000、0.001、0.010、0.100、1.000 mmol/L)一氧化氮供体硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)对猪腔前卵泡体外培养的影响。结果表明, SNP 对猪腔前卵泡存活、发育和腔的形成、卵母细胞正常发育有一定促进作用, 但高浓度会产生抑制作用。体外培养后, 各处理组卵泡直径差异不显著($P > 0.05$); 处理第 4 天, 0.001 mmol/L SNP 处理组卵泡存活率(85.28%)显著高于 1.000 mmol/L SNP 处理组(70.60%, $P < 0.05$); 0.001 mmol/L SNP 处理组卵泡成腔率(79.81%)和卵母细胞正常率(50.93%)显著高于 1.000 mmol/L SNP 处理组(55.22%, 35.00%, $P < 0.05$); 0.001 mmol/L SNP 处理组 COC 回收率(23.27%)显著高于其余处理组($P < 0.05$), 其余各处理组差异不显著($P > 0.05$); 1.000 mmol/L SNP 处理组颗粒细胞凋亡率显著高于其他各组($P < 0.05$), 而 0.001 mmol/L SNP 处理组颗粒细胞凋亡率显著低于其他各组($P < 0.05$), 其余各组间差异不显著($P > 0.05$)。

关 键 词: 猪; 腔前卵泡; 体外培养; 一氧化氮; 硝普钠

中图分类号: S857.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2011)01-0055-05

Effects of sodium nitroprusside(a donor of nitric oxide) on development of porcine preantral follicle cultured *in vitro*

QUAN Qing^{1a,1b}, TAO Yong^{1a*}, ZHANG Xiao-rong^{1a*}, YAO Gui-dong², WANG Jin-ju^{1a}

(1. a. College of Animal Science and Technology; b. College of Economy and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; 2. School of Life Science, University of Science and Technology of China, Hefei 230022, China)

Abstract: To understand the effects of sodium nitroprusside (SNP), an NO donor, on the growth and development of porcine preantral follicles *in vitro* culture, follicles were treated with different concentrations of SNP(0.000, 0.001, 0.010, 0.100, 1.000 mmol/L). Results showed there were no significant variances ($P > 0.05$) in the follicular diameter between all treatments during *in vitro* culture; the survival rate in 0.001 mmol/L SNP treatment was significantly higher than that in 1.000 mmol/L SNP treatment(85.28%vs70.60%, $P < 0.05$); the antrum formation and normal rate of oocyte reached highest in 0.001 mmol/L SNP treatment(79.81%, 50.93%), significantly higher than that in 1.000 mmol/L SNP treatment(79.81vs55.22, 50.93%vs35.00%, $P < 0.05$); the recovery rate of cumulus cells oocyte complexes (COC) in 0.001 mmol/L SNP treatment was significantly higher than that of control and any other treatments (23.27 vs 15.00 vs 13.89 vs 11.67 vs 8.33, $P < 0.05$), there were no significant difference between other treatments ($P > 0.05$); the granulose apoptosis in 1.000 mmol/L SNP treatment was significantly higher than that in other treatments($P < 0.05$), while that in 0.001 mmol/L SNP treatment was significantly lower than that in other treatments($P < 0.05$), there were no significant differences between other treatments($P > 0.05$). Certain SNP was beneficial to the survival, development, antrum formation of preantral follicle and normal development of oocytes, while high level of SNP has toxic effect.

Key words: pig; preantral follicle; *in vitro* culture; nitric oxide(NO); sodium nitroprusside (SNP)

收稿日期: 2010-07-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(30600432); 安徽省优秀青年科技基金项目(06041081)

作者简介: 权青(1980—),男,安徽宿州人,硕士,主要从事动物胚胎工程研究,qqing336@sina.com; *通信作者, apieceofgrass@163.com;

zxr@ahau.edu.cn

腔前卵泡是哺乳动物卵泡发育的早期阶段。大量的腔前卵泡在发育到有腔卵泡前发生闭锁、退化,没有得到充分利用,这无疑是动物遗传与繁育资源的极大损失。哺乳动物腔前卵泡体外培养的研究有助于揭示卵泡发育的过程及其机制,可以最大限度利用卵巢资源,促进动物繁殖,保护濒临灭绝物种以及人类生殖健康。一氧化氮(NO)是目前在体内发现的最小、最轻、最简单的生物信息分子^[1]。大量研究发现,NO在心血管、神经、循环、呼吸、消化、免疫等系统中都具有重要作用,也参与了卵泡的发育、排卵、黄体功能、卵母细胞减数分裂的成熟、胚胎着床、妊娠维持、调节分娩以及精子的发生、受精等^[2-5]。硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)作为常用的NO供体之一,已被许多学者用于NO的研究。有关SNP在猪腔前卵泡生长发育方面的研究还不够成熟。笔者研究不同浓度SNP对体外培养猪腔前卵泡生长发育的影响,旨在建立一套适合猪腔前卵泡体外生长发育的培养体系。

1 材料与方法

1.1 材料

猪卵巢从合肥市四河屠宰场采集,用保温瓶(装有37℃添加抗生素的灭菌生理盐水)3h内运回实验室。

1.2 腔前卵泡的分离和选择

挑选表面无黄体且无大卵泡的中等卵巢,用生理盐水冲洗后,去除卵巢周围的组织,用生理盐水冲洗1次,75%酒精浸润2次,每次10~15s,再用生理盐水冲洗,然后转入无菌环境。分离时,用眼科剪将皮质部分剪成1~3mm的碎片,用DPBS清洗皮质碎片,再将碎片置于一次性塑料培养皿的卵泡分离液中,用装有针头的1mL注射器在显微镜下分离卵泡^[6]。分离的卵泡收集于卵泡收集液中,用培养液洗4次后,挑选直径230~270μm的健康卵泡(卵泡卵母细胞和颗粒细胞完全被基底膜、膜细胞和基质组织包围)进行培养^[7]。

1.3 腔前卵泡的培养

基础培养液为NCSU23,添加7.5%的FBS,2.5μg/mL的FSH,3.5μg/mL的胰岛素,10μg/mL的转铁蛋白和100μg/mL的抗坏血酸,培养液用前在

38.5℃5%CO₂培养箱中至少平衡4h。采用96孔培养板,每孔200μL培养液,每孔表面覆盖50μL矿物油。将挑选好的腔前卵泡随机分到不同的试验组(SNP浓度分别为0.001、0.010、0.100、1.000mmol/L)中,每孔1个卵泡,共培养4d,每48h半量换液1次。

1.4 指标判断标准

1) 卵泡直径。测量培养前(第0天)卵泡直径,以后每隔1天(即第2天、第4天)测量1次直径。由于腔前卵泡的形态并非总是呈标准的圆形,所以,以基底膜外缘为准,选择测量最长距离(长径)和最短距离(短径),取平均值。

2) 卵泡存活率。培养的第2天、第4天观察卵泡存活情况,凡卵泡生长停滞,卵母细胞不再被颗粒细胞层包围或颗粒细胞变黑、具有致密体以及严重皱缩,卵母细胞从卵泡中逸出以及形态严重变形的均视为卵泡死亡;卵泡具有圆形的卵母细胞,以及卵母细胞没有明显退化的视为存活卵泡^[8]。卵泡存活率表示为存活卵泡占入培卵泡的百分比。

3) 卵泡成腔率。培养第2天、第4天观察卵泡成腔情况,以颗粒细胞层内出现明显的空隙视为卵泡成腔。成腔率表示为成腔的卵泡数占存活卵泡的百分比^[9]。

4) 卵母细胞正常率和COC回收率。培养结束后,刺破卵泡,如卵泡刺破后未见卵母细胞,则认为卵母细胞已退化降解。COC表示卵泡刺破后,卵母细胞透明带表面50%以上区域被颗粒细胞包围的卵丘-卵母细胞复合体^[7];卵母细胞轮廓不规则以及胞质固缩化均视为卵母细胞不正常。卵母细胞正常率表示为获取的正常的卵母细胞数占入培卵泡的百分比;COC回收率表示为每组获得的COC数占该组入培卵泡数的百分比。

5) 颗粒细胞凋亡检测。取出培养第4天的卵泡,刺破收集颗粒细胞,用Hoechst33258进行荧光染色,在荧光显微镜下观察颗粒细胞的凋亡情况^[10]。正常细胞的细胞核呈正常的蓝色,凋亡细胞的细胞核呈现出碎块状致密浓染。

1.5 数据统计

试验所得数据采用SPSS3.0软件进行方差分析,用LSD法进行检验分析。

2 结果与分析

2.1 SNP 对体外培养猪腔前卵泡生长的影响

由表 1 可知，开始培养前，卵泡直径各处理组

间差异不显著；在培养 4 d 的过程中，卵泡持续生长，卵泡直径随培养时间增加而增大。在培养第 2 天、第 4 天的卵泡平均直径各组间差异不显著，说明各处理组对卵泡体外培养直径增长的影响不大。

表 1 SNP 对猪腔前卵泡体外生长的影响
Table 1 Effects of SNP on the growth of porcine preantral follicles cultured in vitro

SNP 浓度/(mmol·L ⁻¹)	卵泡数/个	卵泡直径/μm			存活率/%	
		第 0 天	第 2 天	第 4 天	第 2 天	第 4 天
0.000	55	240.20±19.56	263.80±22.69	288.39±27.96	(94.45±6.09)ab	(81.67±11.63)ab
0.001	57	240.69±17.35	265.10±20.12	291.66±29.87	(96.29±5.74)a	(85.28±12.13)a
0.010	58	241.11±19.46	264.78±21.48	290.03±26.92	(92.96±8.36)ab	(81.11±11.63)ab
0.100	58	242.94±19.00	265.75±22.21	289.81±24.51	(91.29±8.24)ab	(81.11±3.91)ab
1.000	55	242.54±17.47	263.38±21.44	285.59±29.66	(87.18±8.45)b	(70.60±12.09)b

SNP 浓度/(mmol·L ⁻¹)	成腔率/%		卵母细胞正常率/%	COC 回收率/%	凋亡率/%
	第 2 天	第 4 天			
0.000	25.88±20.37	(67.59±10.32)ab	(43.33±8.16)ab	(15.00±10.49)b	(23.07±1.52)a
0.001	30.83±17.44	(79.81±16.49)a	(50.93±9.23)a	(23.70±4.95)a	(14.93±2.54)b
0.010	29.17±26.16	(63.84±19.96)ab	(45.00±11.88)ab	(13.89±5.65)b	(22.10±2.60)a
0.100	27.04±20.16	(63.69±9.89)ab	(41.67±7.53)ab	(11.67±4.08)b	(19.97±1.25)a
1.000	14.53±13.11	(55.22±10.22)b	(35.00±10.49)b	(8.33±7.53)b	(34.77±2.05)c

2.2 SNP 对体外培养猪腔前卵泡存活率与成腔率的影响

由表 1 可知，培养的第 4 天，卵泡存活率 0.001 mmol/L SNP 处理组显著高于 1.000 mmol/L 处理组，与其他各处理组间差异不显著。此外，与对照组相比，0.001 mmol/L SNP 组要高于对照组，但差异不显著，1.000 mmol/L SNP 组要低于对照组，差异不显著。成腔率在第 4 天开始表现显著差异，但以 0.001 mmol/L SNP 处理组成腔率最高，约达到 80%。以上结果说明，卵泡培养液中添加一定浓度(如 0.001 mmol/L)的 SNP 有利于促进卵泡成腔，而此后随着 SNP 浓度的提高，则具有抑制成腔的作用。

2.3 SNP 对体外培养猪腔前卵泡卵母细胞正常率以及 COC 回收率的影响

由表 1 可知，从卵母细胞正常率看，0.001 mmol/L SNP 处理组显著高于 1.000 mmol/L SNP 处理组外，其余各组差异不显著，但 0.001 mmol/L SNP 处理组卵母细胞正常率最高。从 COC 回收率方面看，0.001 mmol/L SNP 处理组 COC 回收率显著高于其余各组，其余各处理组差异不显著。

2.4 SNP 对体外培养猪腔前卵泡颗粒细胞凋亡的影响

在荧光显微镜下观察到凋亡细胞核形态呈浓染、碎裂、固缩。表 1 结果表明，1.000 mmol/L SNP 处理组凋亡率显著高于其他各组，而 0.001 mmol/L SNP 处理组凋亡率显著低于其他各组，其余各组间差异不显著。

3 结论与讨论

a. SNP 对腔前卵泡生长的影响。试验结果表明，各处理组对卵泡体外培养直径增长的影响差异不显著。腔前卵泡发育受多种因子调控，如细胞因子、生长因子和局部产生的物质，其中 NO 是作为生长促进因子而起作用的。研究表明，卵巢 NO/NOS 系统在调控卵泡生长方面起重要作用^[11]。eNOS 和 NOS 在猪卵巢中有特异性表达，在不同阶段的卵泡有不同的表达模式^[12]。Rosselli 等通过测定卵泡培养过程中 NO 水平的变化，发现在卵泡的不同生长阶段，NO 的水平也是变化的，从而揭示了 NO 在卵泡发育过程中可能具有一定的作用。NO 供体浓度的高低对体外培养卵泡生长有一定的影响^[13]。本

试验结果与 NO 具有减缓体外培养小鼠卵泡生长的结果^[14]不一致,这可能是物种之间的差异致的,或是腔前卵泡处于卵泡发育的早期,对 SNP 的敏感性反应比较滞后所导致的。

b. SNP 对腔前卵泡存活的影响。本研究结果表明,0.001 mmol/L SNP 有利于卵泡存活,而 1.000 mmol/L SNP 对卵泡具有毒性作用,不利于卵泡存活。局部低浓度的 NO 有助于卵泡生长,并可能抑制细胞凋亡;高浓度的 NO 则有可能以过氧化亚硝酸盐的形式促进细胞凋亡,不利于卵泡的存活。Matsumi 等^[15]认为,NO 是大鼠卵泡中的细胞生长抑制因子,能抑制卵泡的闭锁和卵泡细胞的凋亡。NO 还能诱导包括人类的许多物种卵泡细胞的凋亡,促进卵泡的闭锁^[16]。

c. SNP 对腔前卵泡成腔的影响。卵泡培养液中添加 0.001 mmol/L SNP 有利于卵泡成腔,但高浓度 SNP 对卵泡成腔具有抑制作用。卵泡腔的形成是卵泡生长加速、有丝分裂活动增加及卵泡液积累作用的结果。大部分卵泡液是由有腔卵泡在排卵前不久产生的,主要是血浆渗出液和颗粒细胞分泌液^[17]。由腔前卵泡阶段转化为有腔阶段是卵泡发育过程中的重要一步,需要卵泡内复杂信号的精确调控。只有发育到有腔卵泡后,许多的 GC 尤其是与卵母细胞联系密切的 GC 才能分化成卵丘细胞,而卵丘细胞可接受排卵前的 LH 峰刺激而导致卵泡发生排卵^[18]。采用多卵泡培养体系,腔前卵泡能发育成熟并排卵^[19]。NO 不是猪腔前卵泡成腔过程中的关键因子,但高浓度外源性的 NO 能抑制卵泡成腔。

d. SNP 对腔前卵泡卵母细胞正常率以及 COC 回收率的影响。培养腔前卵泡的目的是获取正常的卵母细胞和 COC。本试验中除 1.000 mmol/L SNP 外,其他各组卵母细胞正常率差异不显著,这可能是由于腔前卵泡对 SNP 的敏感性较低,也可能是由于卵泡是一个完整的结构,直接受到 SNP 的毒性刺激要少。一定浓度的 NO 能够促进卵母细胞的成熟,iNOS 来源的 NO 调节鼠生发泡的破裂和第一极体的排出^[18,20],诱导型和内皮型 NOS 来源的 NO 对猪卵母细胞的成熟起促进作用^[19,21]。此外,NO 供体 SNP 还具有降低外源 PGF2 α 对小卵泡和中等卵泡卵母细胞减数分裂成熟的抑制作用^[20,22]。

0.001 mmol/L SNP 组 COC 回收率显著高于其他各处理组,说明培养液中低浓度 SNP 的存在有利于卵泡 GC 和卵母细胞之间正常的信息交流。

e. SNP 对腔前卵泡颗粒细胞凋亡的影响。0.001 mmol/L SNP 能抑制猪颗粒细胞的凋亡,而 1.000 mmol/L SNP 促进颗粒细胞的凋亡。除 1.000 mmol/L SNP 外,其他各组卵母细胞正常率差异不显著。在卵泡发育过程中,颗粒细胞的增殖、分化起着重要的作用,颗粒细胞大量凋亡将会影响卵泡的正常发育成熟过程^[21,24]。NO 对体外培养的卵泡颗粒细胞的凋亡有明显的影响,但具体作用在不同物种不同 NO 浓度时也不相同。据报道,0.500 mmol SNP 或 SNAP 对人^[22]和鼠的颗粒细胞凋亡有抑制作用^[23,25];0.010 mmol SNP 对牛的颗粒细胞凋亡有促进作用,1.000 mmol SNP 有抑制作用^[24,26]。本研究中,SNP 对颗粒细胞凋亡的影响与上述学者^[21]的结果不一致,可能是由于研究对象不同造成的(本试验研究的是腔前卵泡颗粒细胞),或者是由于动物物种差异造成的。

参考文献:

- [1] 刘建国,王先.一氧化氮和细胞因子之间的调节作用[J].生理科学进展,2000,31(1):61-64.
- [2] Lee T H, Wu M Y, Chen M j, et al. Nitric oxide is associated with poor embryo quality and pregnancy outcome in *in vitro* fertilization cycles[J]. Fertil Steril, 2004, 82(1): 129-131.
- [3] Kuo R C, Baxter G T, Thompson S H, et al. NO is necessary and sufficient for egg activation at fertilization[J]. Nature, 2000, 406: 633-636.
- [4] Mitchell L M, Kennedy C R, Hartshorne G M. Pharmacological manipulation of nitric oxide levels in mouse follicle cultures demonstrates key role of extrafollicular control ovulation[J]. Hum Reprod, 2004, 19: 1705-1712.
- [5] Orsin M. Embryo toxicity of the nitric oxide donor sodium nitroprusside in preimplantation bovine embryos *in vitro*[J]. Anim Reprod Sci, 2006, 91: 225-336.
- [6] Viana K S, Caldas-Bussiere M C, Matta S G C, et al. Effect of sodium nitroprusside, a nitric oxide donor, on the *in vitro* maturation of bovine oocytes[J]. Anim Reprod Sci, 2006, 10: 1016.
- [7] Mao J, Smith M F, Rucker E B, et al. Effect of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on porcine preantral follicular, antrum formation, and stimulation of

- granulosa cell proliferation and suppression of apoptosis *in vitro*[J]. J Anim Sci, 2004, 82: 1967–1975.
- [8] 李海, 周虚, 安铁洙. 神经生长因子对牛腔前卵泡体外培养的影响[J]. 中国兽医科技, 2005, 35(2): 139–142.
- [9] Itoh T, Kacchi M, Abe H, et al. Growth, antrum formation, and estradiol production of bovine preantral follicles cultured in a serum-free medium[J]. Biol Reprod, 2002, 67: 1099–1105.
- [10] Hirokazu M, Katsuo I, Yasuhiko O, et al. Gonadotropins and cytokines affect luteal function through control of apoptosis in human luteinized granulosa cells[J]. J Clinical Endocrinology, 2000, 85(4): 1620–1626.
- [11] Bredt D S, Hwang P M, Synder S H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide[J]. Nature, 1990, 347: 768–770.
- [12] Takesue K, Tabata S, Sato F, et al. Expression of nitric oxide synthase-3 in porcine oocytes obtained at different follicular development[J]. J Reprod Dev, 2003, 49: 135–140.
- [13] Rosselli M, Keller P J, Dubey R K. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction [J]. Hum Reprod Update, 1998, 4: 3–24.
- [14] Leila M, Richard C, Hart G M. Expression of nitric oxide synthase and effect of substrate manipulation of the nitric oxide pathway in mouse ovarian follicles[J]. Hum Reprod, 2004, 19: 30–40.
- [15] Matsumi H, Yano T, Osuga Y, et al. Regulation of nitric oxide synthase to promote cytotaxis in ovarian follicular development[J]. Biol Reprod, 2000, 63: 141–146.
- [16] Sugino N, Takiguchi S, Ono M, et al. Nitric oxide concentrations in the follicular fluid and apoptosis of granulosa cells in human follicles[J]. Hum Reprod, 1996, 11(11): 2484–2487.
- [17] 王建辰, 章孝荣. 动物生殖调控[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1998: 64–77.
- [18] Diaz F J, O'Brien M J, Wigglesworth K, et al. The preantral granulosa cell to cumulus cell transition in the mouse ovary: Development of competence to undergo expansion[J]. Dev Biol, 2006, 299: 91–104.
- [19] 袁安文, 薛立群, 向建洲, 等. 小鼠腔前卵泡体外发育和体外排卵的研究[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2001, 27(4), 312–316.
- [20] Huo L J, Liang C G, Yu L Z, et al. Inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide regulates germinal vesicle breakdown and first polar body emission in the mouse oocyte[J]. Reproduction, 2005, 129(4): 403–409.
- [21] Tao Y, Xie H, Hong H, et al. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on porcine oocyte meiotic maturation [J]. Zygote, 2005, 13(1): 1–9.
- [22] Voznesenskaia T, Blashkiv T V. The effects of no synthase blocker, no donor, and exogenous prostaglandins E2 and F2alpha on murine oocytes[J]. Eksp Klin Farmakol, 2005, 68(5): 32–35.
- [23] Kim J M, Yoon Y D, Tsang B K. Involvement of the Fas/Fas ligand system in p53-mediated granulosa cell apoptosis during follicular development and atresia[J]. Endocrinology Philadelphia, 1999, 140: 2307–2317.
- [24] Jee B C, Kim S H, Moon S Y. The role of nitric oxide on apoptosis in human luteinized granulosa cells: Immunocytochemical evidence[J]. Gynecol Obstet Invest, 2003, 56(3): 143–147.
- [25] Yoon S J, Choi K H, Lee K A. Nitric oxide-mediated inhibition of follicular apoptosis is associated with HSP70 induction and Bax suppression[J]. Mol Reprod Dev, 2002, 61(4): 504–510.
- [26] Basini G F, Ponderato G N, Bussolati S, et al. Lipid hydroperoxide and cGMP are not involved in nitric oxide inhibition of steroidogenesis in bovine granulosa cells[J]. Reprod Fertil Dev, 2000, 12: 289–295.

责任编辑: 王赛群

英文编辑: 罗文翠