

猪胎儿卵母细胞发生早期的细胞凋亡变化

霍道坦¹ 陶勇^{1*} 王勇² 权青¹ 田宁宁¹ 成志军¹ 章孝荣¹

1. 安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036; 2. 安徽安泰农业开发有限责任公司, 宣城 242200

摘要 为研究猪卵母细胞发生早期卵巢上细胞的凋亡情况, 制作妊娠 33、40、46、54、61 d 母猪胎儿卵巢的石蜡切片, 并进行荧光染色。结果发现, 母猪妊娠到 33 d 时, 胎猪卵巢上即可见原始生殖细胞和卵原细胞的凋亡, 随着妊娠时间的延长, 凋亡也逐渐增加, 妊娠 33、40、46、54 和 61 d 母猪胎儿卵巢上卵原细胞的凋亡率分别为 3.13%、4.32%、5.50%、9.43% 和 11.10%, 同时, 颗粒细胞的凋亡率则分别为 8.89%、12.45%、14.74%、17.96% 和 22.81%。结果说明, 在猪胎儿卵母细胞发生早期, 即开始发生了卵原细胞和颗粒细胞的凋亡, 且有逐渐增加的趋势。

关键词 胎儿; 猪; 卵巢; 卵原细胞; 凋亡

中图分类号 Q 954.4 文献标识码 A 文章编号 1000-2421(2010)01-0071-04

卵母细胞的发生是胚胎发育过程中的重要生理事件。卵母细胞发生时, 即使是在生理条件下, 也不是所有卵原细胞都发育到减数分裂阶段, 绝大部分经凋亡后闭锁退化。就是那些启动减数分裂的卵母细胞, 也有相当数量在发育着的卵泡中凋亡(闭锁)^[1]。经典理论认为^[2], 大多数哺乳动物的卵原细胞经大量增殖后, 在胎儿出生前后便停止增殖, 即不再能产生新的卵原细胞, 而是数量一直减少。母猪妊娠后 1 至 2 个月是雌性胎儿卵母细胞发生的关键时期, 为阐明在卵母细胞发生中细胞凋亡情况及变化特点, 笔者以猪胎儿为研究对象, 测定猪卵巢发生过程中卵原细胞的凋亡情况, 以期认识和利用卵母细胞发生、发育和退化规律奠定基础。

材料与方法

材料

生长发育良好的二元杂交母猪, 配种当天计为妊娠 0 d。对分别妊娠至 33、40、46、54、61 d 的母猪用前列烯醇进行流产, 采集胎猪, 标记并放入有冰袋的保温箱内立即带回实验室。

猪胎儿卵巢切片的制备

将带回实验室的胚胎用 PBS 清洗后, 打开腹腔剥离卵巢。33 胎龄时外观不能分辨性别时, 剥离性腺, 用组织学方法染色判断。将所得卵巢用 4% 多

聚甲醛 4 固定过夜, 梯度乙醇中脱水, 用二甲苯作透明处理, 再浸蜡包埋。用组织切片机切成 3~5 μm 厚的石蜡切片(连续切片, 分别进行组织学和荧光染色), 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱放置 24 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

卵巢切片的组织学染色

将石蜡切片脱蜡复水后, 苏木精伊红染色, 显微镜下观察拍照。

卵巢切片荧光染色

将石蜡切片脱蜡复水后, 用 PBS 洗 2 遍, 每次 3 min, 吸尽液体; 加入 Hoechst 33258 染色液, 染色 5 min; 去染色液, 用 PBS 洗 2 遍, 每次 3 min, 吸尽液体; 滴 1 滴抗淬灭封片液, 盖上一洁净的盖玻片, 尽快上荧光显微镜观察拍照。根据此前文献报道的方法^[3-5], 分别统计 15 个视野下的凋亡的细胞数, 计算细胞凋亡率。

结果与分析

根据凋亡细胞的特点, 通过荧光染色可观察到凋亡的细胞。在荧光显微镜下, 可观察到凋亡细胞的细胞核形态呈现浓染、碎裂、固缩(图版)。胎龄为 33 d 的胎猪卵巢组织切片(图版 -A1)在荧光染色后发现少量的细胞核浓染(图版 -A2); 胎龄为 40 d 的胎猪卵巢组织切片(图版 -B1), 在荧光染色后, 除了观察到卵原细胞的凋亡外, 还可见凋亡的膜

收稿日期: 2009-03-07; 修回日期: 2009-06-28

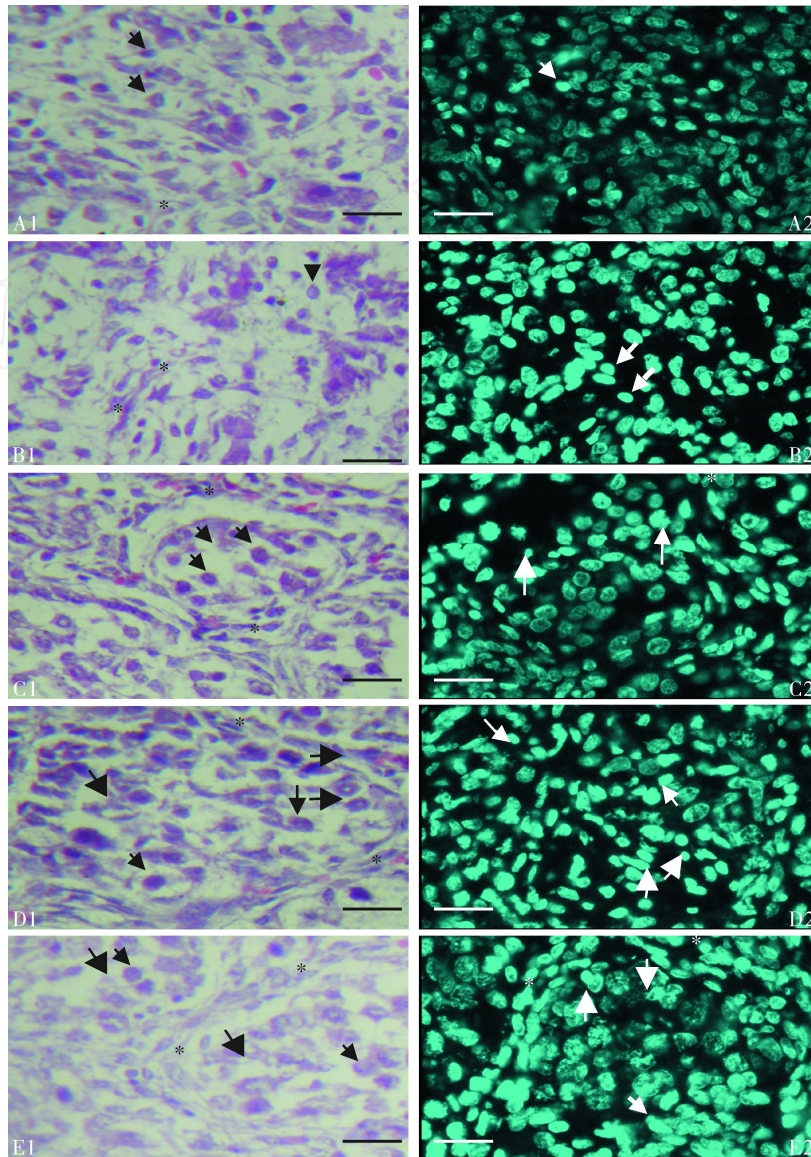
* 国家自然科学基金项目(30600432)资助

** 通讯作者. E-mail: apieceofgrass@163.com

霍道坦, 男, 1982 年生, 硕士研究生. 研究方向: 胚胎工程. E-mail: hdt-123@163.com

细胞(图版 -B2);胎龄为 46 d 的胎猪卵巢组织切片(图版 -C1),在荧光染色后发现,细胞核固缩浓染的细胞数量增加(图版 -C2);胎龄为 54 d 的胎猪卵巢组织切片,可见细胞间隙扩大(图版 -D1),在荧光染色后,可观察到大量的细胞发生凋亡,包括

卵原细胞、颗粒细胞和膜细胞(图版 -D2);胎龄为 61 d 的胎猪卵巢组织切片可见,细胞间隙也更加明显(图版 -E1),在荧光染色后发现凋亡的细胞数量进一步增加(图版 -E2)。



A1. 33 日龄胎儿卵巢 HE 染色 Histology staining of porcine fetus ovarian tissue 33 dpc; A2. 33 日龄胎儿卵巢荧光染色 Fluorescence staining of porcine fetus ovarian tissue 33 dpc; B1. 40 日龄胎儿卵巢 HE 染色 Histology staining of porcine fetus ovarian tissue 40 dpc; B2. 40 日龄胎儿卵巢荧光染色 Fluorescence staining of porcine fetus ovarian tissue 40 dpc; C1. 46 日龄胎儿卵巢 HE 染色 Histology staining of porcine fetus ovarian tissue 46 dpc; C2. 46 日龄胎儿卵巢荧光染色 Fluorescence staining of porcine fetus ovarian tissue 46 dpc; D1. 54 日龄胎儿卵巢 HE 染色 Histology staining of porcine fetus ovarian tissue 54 dpc; D2. 54 日龄胎儿卵巢荧光染色 Fluorescence staining of porcine fetus ovarian tissue 54 dpc; E1. 61 日龄胎儿卵巢 HE 染色 Histology staining of porcine fetus ovarian tissue 61 dpc; E2. 61 日龄胎儿卵巢荧光染色 Fluorescence staining of porcine fetus ovarian tissue 61 dpc.

图中箭头所指为凋亡细胞。Black arrows display the oocytes, black arrowheads display the granulosa cells and asterisks display the membrane cells. The white counterparts show the apoptotic cells. Bar = 20 μ m.

图 1 胎猪卵巢上凋亡细胞的检测

Fig. 1 Determination of apoptotic cells on fetal porcine ovaries

统计猪胎儿各日龄卵原细胞的凋亡情况,结果见表 1。可以看出,妊娠到 33 d 时,胎猪卵巢上即可见原始生殖细胞和卵原细胞的凋亡,随着妊娠时间的延长,卵原细胞的凋亡率也逐渐增加,妊娠 33、40、46、54 和 61 d 母猪胎儿卵巢上卵原细胞的凋亡率分别为 3.13 %、4.32 %、5.50 %、9.43 %和 11.10 %。其中,从妊娠 46 d 到 54 d 时,凋亡增加尤其明显。

表 1 胎猪卵巢上卵原细胞的凋亡变化

Table 1 The oögonium apoptosis change on fetal porcine ovaries

胎猪日龄 Days post coitum	凋亡细胞数 Number of apoptotic cells	统计细胞数 Counted cell number	凋亡率/ % Apoptosis rate
33	10	310	3.13
40	25	554	4.32
46	35	601	5.50
54	75	720	9.43
61	80	641	11.10

统计胎猪各日龄颗粒细胞凋亡率结果如表 2。从表 2 中可以看出,妊娠到 33 d 时,胎猪卵巢上即可见颗粒细胞细胞的凋亡,随着妊娠时间的延长,凋亡率逐渐增加,妊娠 33、40、46、54 和 61 d 母猪胎儿卵巢上颗粒细胞的凋亡率则分别为 8.89 %、12.45 %、14.74 %、17.96 %和 22.81 %。

表 2 胎猪卵巢上颗粒细胞的凋亡变化

Table 2 The granulosa cell apoptosis change on fetal porcine ovaries

胎猪日龄 Days post coitum	凋亡细胞数 Number of apoptotic cells	统计细胞数 Counted cell number	凋亡率/ % Apoptosis rate
33	294	3 307	8.89
40	395	3 172	12.45
46	441	2 992	14.74
54	501	2 790	17.96
61	539	2 362	22.81

讨 论

细胞凋亡是细胞在基因活动指导下发生的一系列分子、形态和生化改变所引起的细胞死亡,主要表现为细胞缩小、染色质浓缩、边移、细胞骨架解体、核 DNA 在核小体接处断裂、电泳呈特征性的梯形排列^[6]。近几年研究表明,细胞凋亡是配子正常发生过程中的重要事件,可通过细胞凋亡来调控生殖细胞的数量和质量^[7]。猪卵原细胞有丝分裂活性高峰,在妊娠的 40~50 d 之间,其数目迅速增加,50 d 后则明显下降,分娩后新生的猪卵巢中,只存在少量卵原细胞^[8]。而对于猪卵母细胞发生早期过程中细胞凋亡情况尚未见报道。

本试验研究发现,随着日龄的增加,卵原细胞和颗粒细胞的凋亡都增加,表明凋亡的发生伴随着猪

卵母细胞的发生过程。何宝祥等在研究水牛时也发现,在 5~6 月龄水牛胎儿卵巢发生过程中,生殖细胞和卵泡细胞都有凋亡发生^[9]。

哺乳动物胎儿时期生殖细胞发生了大量变性和退化,尤其卵母细胞进入第一次减数分裂前期时。Black 等^[10]研究发现,胎猪妊娠 50 d 时进入减数分裂的卵母细胞几乎都经历变性。Bielańska-Osuchowska^[11]发现,卵母细胞在形成卵簇(egg cluster)后变性加强,生殖细胞在卵巢中变性以一定次序出现,并观察到卵巢发育过程中出现 3 次变性峰。本次研究发现胎猪卵原细胞的变性从妊娠第 33 天已经开始,妊娠 40 d 时卵原细胞核形状不规则,或发生皱缩,妊娠 46 d 共质体样细胞团中部分卵原细胞核固缩或出现空泡。这说明卵原细胞在增殖过程中变性始终存在。当卵原细胞分化为卵母细胞时,变性似乎更为明显。妊娠 54 d 胎猪卵巢合胞体样卵母细胞群中,部分卵母细胞核出现固缩,空泡或退化消失,妊娠 61 d 时这种趋势得到加强,此时髓质中的卵泡结构发生了退化。此前已有许多试验证明,卵母细胞的变性或退化、死亡、丢失等,大都是细胞凋亡引起的^[12]。

凋亡是一种不同于坏死的细胞死亡方式,是受基因控制的一种程序性的细胞自然死亡,凋亡的细胞往往先形成凋亡小体^[13]。卵泡中的颗粒细胞的发育与凋亡,对于卵泡的生长发育和其中卵母细胞的生长发育至关重要,但卵巢凋亡是极其复杂的调控过程。近年来,细胞凋亡机制的研究非常活跃。Manabe 等^[14]总结了猪卵泡中颗粒细胞凋亡的分子机理,认为死亡配体(death ligand)与其受体的互作,以及启动的后续细胞内信号转导乃是关键原因。参与其中的蛋白(家族)及基因众多,有 Fas ligand 及受体系统,肿瘤坏死因子 α (TNF α)及受体系统,TNF α 相关诱导凋亡配体(TRAIL)及受体系统, caspase 家族, bcl 家族, bax 家族, Fas 相关死亡区蛋白(FADD), TNF1 型受体相关死亡区蛋白(TRADD), Apaf1, TRAF2 和 cFLIP 等。最近有报道发现, X 连锁凋亡抑制蛋白(XIAP)作为一种凋亡抑制候选分子,能通过抑制猪卵泡颗粒细胞内凋亡信号转导通路发挥凋亡抑制功能^[15]。笔者此前的研究发现,一氧化氮也参与猪卵母细胞发生和卵泡发育过程^[16-18],但具体机制尚待进一步的研究。

本试验利用荧光染色检测了胎猪卵母细胞发生早期的细胞凋亡情况,包括卵原细胞和体细胞,为进一步研究猪卵母细胞发生中凋亡变化的机理奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] TILL Y J L, KOWALSKI K I, JOHNSON A L, et al. Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression [J]. *Endocrinology*, 1991, 129(5): 2799-2801.
- [2] 杨增明, 孙青原, 夏国良. 生殖生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2005: 74-75.
- [3] HUSARI A W, DBAIBO G S, BITAR H, et al. Apoptosis and the activity of ceramide, Bax and Bcl-2 in the lungs of neonatal rats exposed to limited and prolonged hyperoxia [J]. *Respir Res*, 2006, 7(1): 100-111.
- [4] WANG G Y, ZHANG J W, LÜ Q H, et al. Berberine induces apoptosis in human hepatoma cell line SMMC7721 by loss in mitochondrial transmembrane potential and caspase activation [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2007, 8(4): 248-255.
- [5] INOKUCHI Y, SHIMAZAWA M, NAKAJIMA Y. Brazilian green propolis protects against retinal damage *in vitro* and *in vivo* [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2006, 3(1): 71-77.
- [6] CUMMINGS M C, WINTERFORD C M, WALKER N I. Apoptosis [J]. *Am J Surg Pathol*, 1997, 21(1): 88-101.
- [7] 王颖, 张庆涛, 岳文斌. 细胞凋亡与哺乳动物配子发生[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2007(1): 51-53.
- [8] BIELANSKA-OSUCHOWSKA Z. Oogenesis in pig ovaries during the prenatal period: ultrastructure and morphometry [J]. *Reprod Biol*, 2006, 6(2): 161-193.
- [9] 何宝祥, 郑喜邦, 杜玉兰, 等. 水牛胎儿卵泡细胞和卵母细胞凋亡的特征[J]. 畜牧兽医学报, 2006, 37(1): 23-27.
- [10] BLACK J L, ERICKSON B H. Oogenesis and ovarian development in the prenatal pig [J]. *Anat Rec*, 1968, 161(1): 45-55.
- [11] BIELANSKA-OSUCHOWSKA Z. Oogonia and oocytes degeneration and the nutritive macrophages in the process of the development of the ovary in embryos of the domestic pig (*Sus scrofa domestica* L.) [J]. *Z Anat Entwickl Gesch*, 1973, 142(1): 37-52.
- [12] 杨晓菁, 姚红军, 王玉凤. 哺乳动物卵母细胞凋亡的研究进展[J]. 动物学杂志, 2004, 39(6): 101-106.
- [13] 杨恬. 细胞生物学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 387-389.
- [14] MANABE N, MATSUDA-MINEHATA F, GOTO Y, et al. Role of cell death ligand and receptor system on regulation of follicular atresia in pig ovaries [J]. *Reprod Domest Anim*, 2008, 43(Suppl 2): 268-272.
- [15] CHENG Y, MAEDA A, GOTO Y, et al. Changes in expression and localization of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) in follicular granulosa cells during atresia in porcine ovaries [J]. *J Reprod Dev*, 2008, 54(6): 454-459.
- [16] 姚桂东, 陶勇, 章孝荣, 等. 一氧化氮供体硝普钠对猪腔前卵泡体外生长和发育的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2009, 40(4): 500-506.
- [17] 成志军, 陶勇, 章孝荣, 等. 卵母细胞发生时猪卵巢一氧化氮合酶的免疫组化定位[J]. 中国农业大学学报, 2009, 14(2): 11-16.
- [18] 成志军, 陶勇, 徐伟, 等. 早期猪胎儿卵巢的组织学观察[J]. 畜牧兽医学报, 2009, 40(1): 32-37.

Apoptosis Change of the Cells on Fetal Porcine Ovaries

HUO Dao-tan¹ TAO Yong¹ WANG Yong² QUAN Qing¹
TIAN Ning-ning¹ CHENG Zhi-jun¹ ZHANG Xiao-rong¹

1. College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China;

2. Antai Agricultural Development Co. Ltd, Xuancheng 242200, China

Abstract Oogenesis is an important physiological event in the process of reproductive development. The present study was undertaken to investigate the apoptosis of the cells on fetal porcine ovaries. The fetal porcine ovaries 33, 40, 46, 54 and 61 days post coitum (dpc) were collected from pregnant sows, respectively, and the paraffin sections were prepared and then stained by fluorescent dye Hoechst 33258. The results showed that the apoptotic cells were observed since 33 dpc in primordial germ cells and oogonium, and the apoptosis rates were 3.13%, 4.32%, 5.50%, 9.43% and 11.10% at 33, 40, 46, 54 and 61 dpc respectively. Meanwhile, the apoptosis rates of granulosa cells were 8.89%, 12.45%, 14.74%, 17.96% and 22.81% at 33, 40, 46, 54 and 61 dpc respectively. These results suggest that the apoptosis of oogonium and follicle cells on fetal porcine ovaries happens and increases at the early stage of oogenesis.

Key words fetus; pig; ovary; oogonium; apoptosis

(责任编辑: 边书京)