

饥饿小鼠卵母细胞中自噬和凋亡的电镜研究

孙小雯^① 沈伟^② 孙晓凤^{②*}

① 青岛农业大学动物科技学院生殖细胞生物学实验室 青岛 266000;

② 青岛农业大学生命科学学院, 山东省高校动物生殖与种质创新重点实验室 青岛 266000

摘要: 小鼠 (*Mus musculus domesticus*) 原始卵泡形成在出生后 3 d 内进行得最剧烈, 此时有大量卵母细胞丢失。出生后不久原始卵泡库就建立起来, 新生鼠都会经历一段时间饥饿再摄入母乳营养, 对出生后的子鼠饥饿处理时, 出现了自噬和凋亡的动态变化, 自噬和凋亡都可以影响细胞的存活, 这很可能与卵母细胞的大量丢失有关。在本项研究中, 将对照组子鼠正常母乳喂养, 处理组子鼠与母鼠分开, 完全不给予母乳。分别收取饥饿 1.5 d 与 2 d 子鼠的卵巢制作电镜切片, 每组 3 只子鼠, 每只子鼠 3 张电镜切片, 每组共统计 9 张切片。在电镜下观察其形态变化。通过观察发现, 饥饿 1.5 d 的子鼠卵巢与正常 1.5 d 的子鼠卵巢相比, 卵母细胞中的自噬小体数量显著增加。这表明, 饥饿处理 1.5 d 促进了卵母细胞的自噬, 这可能有助于维持卵母细胞的形态及存活。饥饿处理 2 d 的子鼠卵巢显示出不同的结果。饥饿 2 d 的子鼠处于生命的临界阶段, 已出现小部分个体死亡。存活子鼠卵巢的电镜形态学观察发现, 与正常哺乳 2 d 的子鼠卵母细胞相比, 饥饿 2 d 子鼠卵母细胞中自噬小体的数量显著减少, 并出现了多数卵母细胞凋亡的现象, 出现许多凋亡小体。本实验研究结果显示, 饥饿处理影响了原始卵泡形成过程中自噬和凋亡动态变化的过程。

关键词: 饥饿; 卵母细胞; 自噬; 凋亡; 小鼠

中图分类号: Q492 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2020) 04-485-06

Morphological Observation of Autophagy and Apoptosis in Starved Mouse Oocytes Using Transmission Electron Microscopy

SUN Xiao-Wen^① SHEN Wei^② SUN Xiao-Feng^{②*}

① *Laboratory of Germ Cell Biology, College of Animal Science and Technology, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266000;*

② *Key Laboratory of Animal Reproduction and Germplasm Enhancement in Universities of Shandong,*

College of Life Sciences, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266000, China

Abstract: The formation of primordial follicles in mice is most intense within 3 days after birth, and a large number of oocytes are lost during this period. The primordial follicle pool is established shortly after birth. Newborns will experience starvation for a period of time before ingesting breast milk nutrition. When mice

基金项目 山东省自然科学基金项目 (No. ZR2017MC033) ;

* 通讯作者, E-mail: xfsun@qau.edu.cn;

第一作者介绍 孙小雯, 女, 硕士研究生; 研究方向: 动物生殖发育与基因工程; E-mail: 15192491186@163.com。

收稿日期: 2020-03-11, 修回日期: 2020-04-23 DOI: 10.13859/j.cjz.202004010

are starved after birth, dynamic changes in autophagy and apoptosis occur. Both autophagy and apoptosis can affect the survival of cells, which is probably related to the loss of oocytes during the formation of primordial follicles. In this study, transmission electron microscopy (TEM) was used to research morphological alterations of ovaries starved for 1.5 d and 2 d, respectively. The ovaries of the newborn mice (*Mus musculus domesticus*) were collected from mice with different treatments for making electron microscope sections. Electron micrographs of ovarian sections were taken by TEM. Compared with normal control oocytes (Fig. 1a), most of the oocytes starved for 1.5 d (Fig. 1b) maintained normal cell morphology, while a large number of apoptotic or pre-apoptotic cells appeared in the ovaries of mice starved for 2 days (Fig. 1c), and almost no normal cells were observed. It was found that the number of autophagosomes in oocytes was significantly increased in mice starved for 1.5 days compared with the control (Fig. 2). All data were analyzed with GraphPad Prism software and were represent as the Mean \pm SD of at least three independent experiments. Student's t-test was used to compare the difference between treatment group and the control. The ovaries of mice starved for 2 days showed evident damages to the ovary. Mice starved for 2 days were at the threshold of life, and a small number of individuals died. TEM morphological observation showed that compared with the control group, the number of autophagosomes in the oocytes of mice starved for 2 days was significantly reduced, and there were more signs of apoptosis in most oocytes (Fig. 3), which suggested that excessive starvation would cause reduced autophagy and apoptosis of a large number of oocytes. The results of this experiment show that starvation treatment affects the dynamic changes of autophagy and apoptosis during the formation of primordial follicles.

Key words: Starvation; Oocytes; Autophagy; Apoptosis; Mice

大量研究结果表明, 卵泡发育过程中存在自噬和凋亡的调节。哺乳动物生殖细胞的储备是有限的, 在原始卵泡形成过程中, 大部分卵母细胞随着发育的进行而消失, 只有一小部分存活下来形成原始卵泡 (Melendez et al. 2003, Wang et al. 2017)。但目前对这个过程中的调节机制尚不清楚。自噬可以通过包裹自身蛋白质与细胞器等进入囊泡, 并与溶酶体结合形成自噬溶酶体进而降解 (Levine et al. 2015, Chakraborty et al. 2017)。自噬可以促进细胞的更新, 累积营养物质, 以更好地供应存活的卵母细胞。饥饿处理后, 许多细胞中都会发生主动自噬。在哺乳动物中, 胎儿通过胎盘从母体获取营养, 出生后从母乳中获取营养。新生动物若经历几个小时的饥饿就足以开始自噬, 以调节细胞数量和能量平衡 (Shamalnasab et al. 2018)。凋亡也是机体自我调节的重要方式, 其为细胞的程序性死亡。在过去的研究中, 人

们普遍认为卵母细胞的丢失与细胞凋亡有关 (Maiuri et al. 2007, Bargiela et al. 2015)。本实验用饥饿处理的方法探究原始卵泡形成过程中卵母细胞自噬和凋亡的动态变化。以期探究原始卵泡形成过程中自噬和凋亡的发生提供形态学依据。

1 材料与方法

1.1 小鼠卵巢样品

本实验所用的所有小鼠 (*Mus musculus domesticus*) 卵巢样品都为野生型 CD1 品系, 该品系小鼠从维塔河实验动物技术有限公司 (中国, 北京) 购买, 之后将购买的成年小鼠 (雄鼠和雌鼠) 饲养在青岛农业大学动物科技学院实验室小鼠房。所有动物实验均经过青岛农业大学伦理委员会的审查和批准 (批准号 2019012)。按照实验室常规饲养小鼠的方法, 将小鼠于相同条件下培养。将单只成年雌鼠于

18:00 时放于单只成年雄鼠笼内合笼 (共合笼 20 只雌鼠), 于次日晨检查是否怀孕, 以阴道口出现白色栓塞为依据, 见栓当日上午被认定为怀孕 0.5 d。将怀孕雌鼠 (共 15 只) 均单独放于笼内饲养, 记录怀孕日期及相关数据。怀孕母鼠 (共 15 只) 于怀孕 19.5 d 生产, 将初生的雌性小鼠随机分为 4 组 (每只母鼠的同窝雌性小鼠被随机分配), 正常 1.5 d 组、饥饿 1.5 d 组、正常 2 d 组、饥饿 2 d 组, 每组个体数不少于 8 只 (处理结束后饥饿 2 d 组 2 只小鼠死亡)。

1.2 小鼠卵巢取材

每组随机取 3 只雌性小鼠一起放入培养皿, 用镊子将小鼠颈椎脱臼, 用 75% 的酒精喷洗干净。用尖镊子将小鼠背部皮肤撕开, 暴露出卵巢部位。用镊子将肾后下方的卵巢与卵巢包膜一起取出, 放入显微镜下用生理盐水制成的约 100 μ l 液滴中。在显微镜下用镊子和 1 ml 注射器将卵巢包膜和其他无用组织剥离, 尽可能将卵巢外的其他组织都剥离干净。在新的生理盐水液滴中吹洗两遍, 洗去多余组织与细胞。取出卵巢放于离心管中于 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3 电镜样品处理

将正常组和饥饿组小鼠的卵巢用生理盐水洗净后, 用锋利的刀片轻轻将卵巢切成小于 1 mm³ 的小组织块, 放于事先配好的 1 mol/L 磷酸缓冲戊二醛固定液中, 在 4 $^{\circ}$ C 固定 2 h 以上。固定好后, 从 4 $^{\circ}$ C 冰箱内取出小块样品用磷酸盐缓冲液漂洗 3 次, 每次约 15 min。之后将组织块进行梯度脱水, 30%、50%、70%、90%、95%、100% 的乙醇中分别脱水 15 ~ 20 min, 100% 的乙醇中再脱水 15 ~ 20 min, 之后入体积比为 1:1 的 100% 乙醇与 100% 丙酮混合液中 15 ~ 20 min, 100% 的丙酮中两次, 分别 15 ~ 20 min。脱水之后用树脂渗透, 先置于体积比 2:1 的比例配制的 100% 丙酮和 Epon812 溶液中, 室温放置 3 ~ 4 h。再于体积比 1:2 比例的 100% 丙酮和 Epon812 中, 室温处理样品 3 ~ 4 h。再用纯包埋剂处理 2 次, 每次处理 3 ~ 4 h,

之后用包埋模具包埋。烘箱提前预热至所需温度, 37 $^{\circ}$ C 烘箱内固定 12 h, 转移至 45 $^{\circ}$ C 烘箱内固定 12 h, 再放入 60 $^{\circ}$ C 烘箱固定 48 h。送青岛农业大学中心实验室切片, 切片完成后用 2% 的盐酸双氧铀染色 20 min, 柠檬酸铅染色 15 min, 后用 HT7700 透射电子显微镜 (HITACHI, Tokyo, Japan) 观察切片。

2 实验结果

2.1 饥饿对子鼠卵母细胞形态的影响

与 1.5 d 的正常组卵母细胞 (图 1a) 相比, 饥饿 1.5 d 的大部分卵母细胞 (图 1b) 维持正常的细胞形态。可见细胞呈现圆形或微椭圆形, 形态饱满, 胞质均匀。核较大, 居中或稍偏一侧, 呈现圆形。无非正常染色质聚集现象。与 2 d 的正常组卵母细胞 (图 1c) 相比, 饥饿 2 d 的子鼠卵巢出现大量凋亡和凋亡前期细胞, 几乎无正常形态细胞。部分细胞处于凋亡前期, 细胞体积变小, 细胞形态发生改变, 形状不规则, 细胞膜完整, 但部分出现发泡现象, 染色质浓缩, 出现边缘化。大部分细胞处于凋亡后期, 细胞形成凋亡小体, 核膜裂解, 染色体出现分离。

2.2 饥饿 1.5 d 小鼠卵母细胞自噬小体增加

自噬小体是由双层膜的吞噬泡不断延伸, 将需要吞噬的细胞器包裹起来, 然后双层膜闭合形成一个闭合的、圆形的小体 (图 2a)。随后, 自噬小体与细胞内溶酶体融合形成自噬溶酶体, 在这个过程中, 自噬小体的膜被降解, 降解后无双层膜, 表现为单层膜包裹着被降解的各种物质 (图 2a)。与 1.5 d 的正常组卵母细胞 (图 2b) 相比, 饥饿 1.5 d 后, 自噬小体的数量显著增加, 证明在适度的饥饿刺激后, 卵母细胞的自噬增加 (图 2c, d)。

2.3 饥饿 2 d 小鼠卵母细胞自噬小体减少、凋亡小体增加

饥饿 2 d, 与正常组相比, 卵母细胞中自噬小体数量显著减少 (图 3)。凋亡时, 细胞体积首先缩小, 细胞膜皱缩并发生内陷, 将胞质分

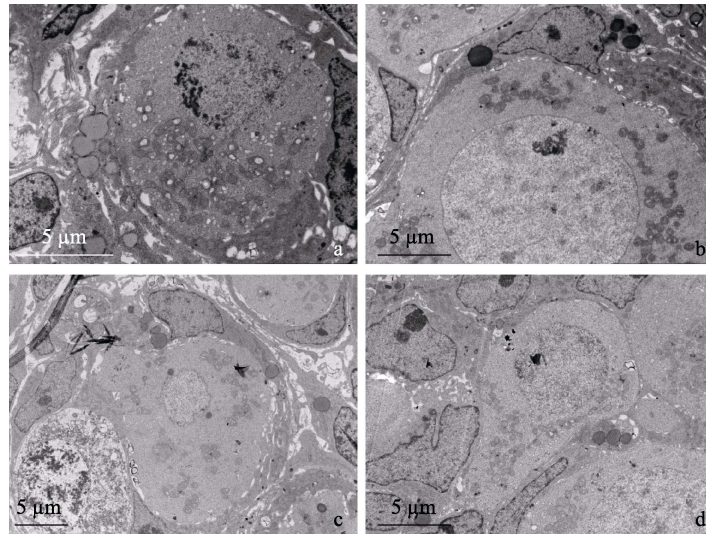


图 1 饥饿处理对卵母细胞形态的影响

Fig. 1 Effect of starvation on oocyte morphology

a. 1.5 d 正常子鼠卵母细胞; b. 饥饿 1.5 d 子鼠卵母细胞; c. 2 d 正常子鼠卵母细胞; d. 饥饿 2 d 子鼠卵母细胞。

a. Oocyte in 1.5 d normal mouse; b. Oocyte in 1.5 d starved mouse; c. Oocyte in 2 d normal mouse; d. Oocyte in 2 d starved mouse.

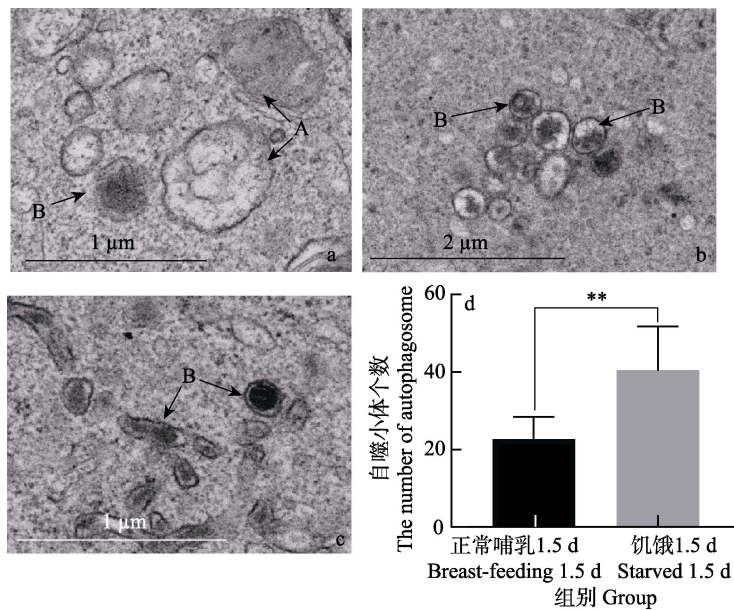


图 2 饥饿 1.5 d 对小鼠卵母细胞中自噬的影响

Fig. 2 Effect of starvation for 1.5 days on autophagy in mouse oocytes

a. 自噬小体和自噬溶酶体; b. 正常 1.5 d 小鼠卵母细胞中的自噬小体; c. 饥饿 1.5 d 小鼠卵母细胞中的自噬小体; d. 正常 1.5 d 小鼠与饥饿 1.5 d 小鼠卵母细胞中自噬小体数统计, **表示二者差异极显著 ($P < 0.001$)。

a. Morphology of autophagosome; b. The autophagosomes in oocyte from 1.5 d normal mouse; c. The autophagosomes in oocyte from 1.5 d starved mouse; d. The number of autophagosomes in 1.5 d normal mouse and 1.5 d starved mouse, **The difference was extremely significant, $P < 0.001$.

A. 自噬溶酶体; B. 自噬小体 A. Autophagolysosome; B. Autophagosome

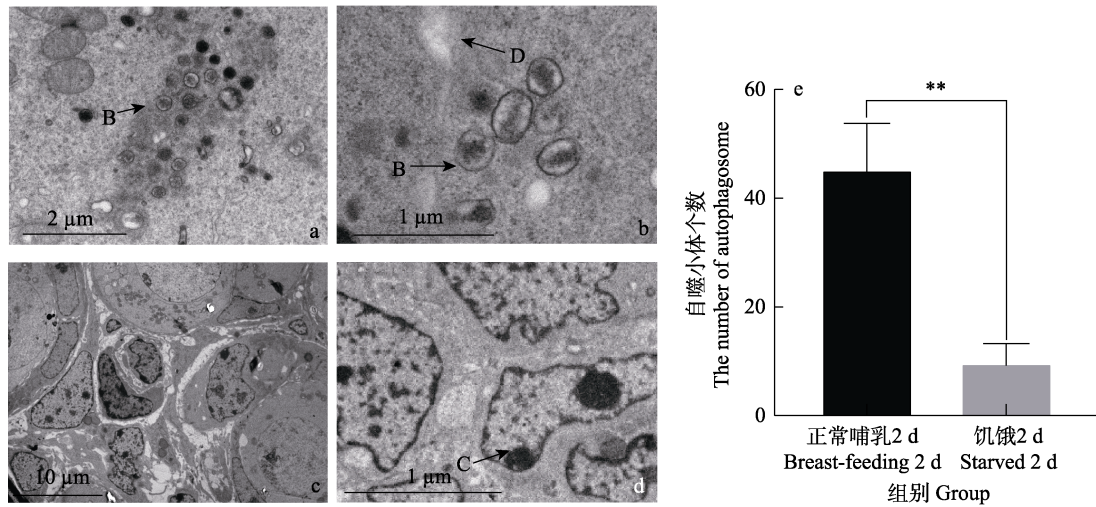


图3 饥饿 2 d 对小鼠卵母细胞中自噬和凋亡的影响

Fig. 3 Effect of starvation for 2 days on autophagy and apoptosis in mouse oocytes

a. 正常 2 d 卵母细胞中的自噬小体; b. 饥饿 2 d 卵母细胞中的自噬小体; c. 正常 2 d 卵母细胞形态; d. 饥饿 2 d 卵母细胞形态; e. 正常 2 d 小鼠与饥饿 2 d 小鼠卵母细胞中自噬小体数统计, **表示二者差异极显著 ($P < 0.001$)。

a. The autophagosomes in oocyte from 2 d normal mouse; b. The autophagosomes in oocyte from 2 d starved mouse; c. Morphology of oocyte from 2 d normal mouse; d. Morphology of oocyte from 2 d starved mouse; e. The number of autophagosomes in 2 d normal mouse and 2 d starved mouse, **The difference was extremely significant, $P < 0.001$

B. 自噬小体; C. 凋亡小体; D. 空泡 B. Autophagosome; C. Apoptosis body; D. Physalides

割开并包裹胞质, 被包裹的胞质中含有细胞器和 DNA 物质, 形成许多凋亡小体。饥饿 2 d 的卵巢中正常细胞形态的卵母细胞数显著减少, 多数卵母细胞凋亡, 形成大量形状不规则的凋亡小体 (图 3c, d)。由此可知, 在饥饿到接近生命临界值时, 大多数卵母细胞自噬减少, 而凋亡增加。

3 讨论

哺乳动物原始卵泡库一旦形成, 其中的原始卵泡在每个发情周期逐次离开并成熟, 这种循环一直持续到生殖周期的结束。由于原始卵泡库中的原始卵泡数目随着排卵周期逐渐减少, 因此雌性哺乳动物生殖寿命主要取决于原始卵泡库内原始卵泡的数目, 而原始卵泡的数目主要取决于围产期前后原始卵泡形成过程, 因为在原始卵泡形成过程中, 有将近三分之二的卵母细胞丢失 (Morita et al. 1999, Pepling et

al. 2001)。因此原始卵泡形成过程中卵母细胞的丢失更是研究热点 (Gebremedhn et al. 2015)。对于卵母细胞的丢失, 很长一段时间认为与细胞凋亡有关, 近几年也有学者提出自噬可能也参与其中, 但具体调节机制尚不清楚。之前主要有两种观点, 一种是认为饥饿会导致卵母细胞凋亡的增加, 进而导致卵母细胞丢失 (Amaravadi et al. 2007)。另一种观点是, 体外剥夺营养数小时后, 对卵巢进行检测发现, 卵母细胞中自噬增加, 并且原始卵泡形成增加 (Ratts et al. 1995)。而本实验发现, 在饥饿过程中, 自噬和凋亡存在一个动态变化的过程, 这个过程也许就是影响原始卵泡形成的重要因素。本研究发现了这个过程的重要转折点为初生小鼠饥饿 1.5 d。在饥饿时间为 1.5 d 时, 自噬小体的数量显著增多, 自噬水平出现显著增加, 卵母细胞形态保持良好, 几乎无凋亡细胞形态。这意味着自噬很可能维持了卵母细胞的

存活, 或抑制卵母细胞向凋亡方向发展。这些自噬的卵母细胞被分解成各种营养组分, 为存活的卵母细胞更好地发育提供了物质保障 (Ireland et al. 2008, Watanabe et al. 2020)。随着饥饿持续, 自噬的主导作用逐渐减弱, 过度营养剥夺使卵巢自噬作用无法维持细胞存活, 进而使凋亡作用成为主导因素。饥饿 2 d 时, 机体达到生命的临界阶段, 少量个体死亡, 存活个体的卵巢内大量细胞发生凋亡。这可能极大程度减少了卵母细胞数量, 影响原始卵泡的形成。本研究为将来探究原始卵泡形成过程提供了在自噬和凋亡方面的形态学依据, 有利于进一步研究卵母细胞自噬和凋亡的作用机制。另外由于新生儿营养供给方式由胎盘转变为母乳, 期间总是需要有一段时间, 本实验以期为新生儿营养供给方式转变时, 饥饿的最适时间提供实验数据的支持。

参 考 文 献

- Amaravadi R K, Yu D, Lum J J, et al. 2007. Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. *Journal of Clinical Investigation*, 117(2): 326–336.
- Bargiela A, Cerro-Herreros E, Fernandez-Costa J M, et al. 2015. Increased autophagy and apoptosis contribute to muscle atrophy in a myotonic dystrophy type 1 *Drosophila* model. *Disease Models & Mechanisms*, 8(7): 679–690.
- Chakraborty T, Mohapatra S, Tobayama M, et al. 2017. Hatching enzymes disrupt aberrant gonadal degeneration by the autophagy/apoptosis cell fate decision. *Scientific Reports*, 7(1): 3183.
- Gebremedhn S, Salilew-Wondim D, Ahmad I, et al. 2015. MicroRNA expression profile in bovine granulosa cells of preovulatory dominant and subordinate follicles during the late follicular phase of the estrous cycle. *PLoS One*, 10(5): e0125912.
- Ireland J L, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, et al. 2008. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. *Biology of Reproduction*, 79(6): 1219–1225.
- Levine B, Packer M, Codogno P. 2015. Development of autophagy inducers in clinical medicine. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(1): 14–24.
- Maiuri M C, Le Toumelin G, Criollo A, et al. 2007. Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *The EMBO Journal*, 26(10): 2527–2539.
- Melendez A, Talloczy Z, Seaman M, et al. 2003. Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*. *Science*, 301(5638): 1387–1391.
- Morita Y, Tilly J L. 1999. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. *Developmental Biology*, 213(1): 1–17.
- Pepling M E, Spradling A C. 2001. Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. *Developmental Biology*, 234(2): 339–351.
- Ratts V S, Flaws J A, Kolp R, et al. 1995. Ablation of bcl-2 gene expression decreases the numbers of oocytes and primordial follicles established in the post-natal female mouse gonad. *Endocrinology*, 136(8): 3665–3668.
- Shamalnasab M, Gravel S P, St-Pierre J, et al. 2018. A salicylic acid derivative extends the lifespan of *Caenorhabditis elegans* by activating autophagy and the mitochondrial unfolded protein response. *Aging Cell*, 17(6): e12830.
- Wang C, Zhou B, Xia G. 2017. Mechanisms controlling germline cyst breakdown and primordial follicle formation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(14): 2547–2566.
- Watanabe R, Sasaki S, Kimura N. 2020. Activation of autophagy in early neonatal mice increases primordial follicle number and improves lifelong fertility. *Biology of Reproduction*, 102(2): 399–411.