

学校编码: 10384

分类号__密级

学号: 24520100154077

UDC

廈門大學

博 士 学 位 论 文

糖尿病对卵母细胞发育的影响及胰岛移植
治疗方法的研究

Study of effects of diabetes on oocyte maturation and islet
transplantation therapy

程盼盼

指导教师姓名: 齐忠权 教授

专 业 名 称: 生理学

论文提交日期: 2013 年 5 月

论文答辩时间: 2013 年 6 月

学位授予日期:

答辩委员会主席:

评 阅 人:

2013 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（免疫抑制剂）课题（组）的科研成果，获得（齐忠权教授）课题（组）经费或实验室资助，在（厦门大学器官移植研究所）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不做特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国硕士、博士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其他方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）

年 月 日

目 录

摘要.....	I
Abstract.....	III
第一章 前言	1
1.1. 糖尿病并发症及其对生殖系统的影响	1
1.1.1. 糖尿病并发症	1
1.1.2. 糖尿病对生殖系统的影响	2
1.2. 糖尿病治疗	4
1.2.1. 胰岛素注射	4
1.2.2. 胰腺移植	5
1.2.3. 胰岛移植	6
1.3. 胰岛移植面临的问题	8
1.3.1. 胰岛的来源	8
1.3.2. 胰岛移植的免疫排斥反应	9
1.4. 间充质干细胞	12
1.4.1. MSCs 的免疫原性	12
1.4.2. MSCs 免疫调节作用	13
1.4.3. MSCs 发挥免疫调节作用的机制	15
1.5. 间充质干细胞在器官移植中的应用	18
1.5.1. MSCs 在实验动物器官移植模型中的应用	18
1.5.2. MSCs 在临床移植中的应用	19
1.5.3. iPSC-MSCs.....	20
1.6. 本文研究的目的、意义及内容	21
第二章 材料与方法	23
2.1. 实验材料	23
2.1.1. 实验动物	23
2.1.2. 主要试剂	23
2.1.3. 主要仪器	25
2.2. 研究方法	26

2.2.1.	小鼠胰岛移植模型	26
2.2.2.	各用药方案	28
2.2.3.	卵母细胞相关实验方法	30
2.2.4.	间充质干细胞培养、表型及功能鉴定	31
2.2.5.	细胞免疫学研究方法	34
2.2.6.	分子生物学研究方法	38
2.2.7.	统计学分析	45
第三章 结果与讨论		46
3.1. 糖尿病对卵母细胞的损伤		46
3.1.1.	糖尿病对小鼠卵母细胞排卵量的影响	46
3.1.2.	糖尿病对小鼠 MII 期卵母细胞纺锤体排列及染色体分布的影响	47
3.1.3.	糖尿病对小鼠 MII 期卵母细胞非整倍体的影响	49
3.1.4.	糖尿病对小鼠 MII 期纺锤体检测点蛋白 <i>Mad2</i> 和 <i>Bub1</i> mRNA 表达的影响	51
3.1.5.	糖尿病对小鼠卵母细胞孤雌激活能力的影响	52
3.1.6.	小结	52
3.2. 胰岛移植逆转糖尿病对卵母细胞的损伤		55
3.2.1.	胰岛移植对糖尿病小鼠体重和血糖的影响	55
3.2.2.	胰岛移植对糖尿病小鼠卵母细胞排卵量的影响	56
3.2.3.	胰岛移植对糖尿病小鼠 MII 期卵母细胞纺锤体排列及染色体分布的影响	57
3.2.4.	胰岛移植对糖尿病小鼠 MII 期卵母细胞非整倍体的影响	58
3.2.5.	胰岛移植对糖尿病小鼠 MII 期纺锤体检测点蛋白 <i>Mad2</i> 和 <i>Bub1</i> mRNA 表达的影响	59
3.2.6.	胰岛移植对糖尿病小鼠卵母细胞孤雌激活能力的影响	60
3.2.7.	小结	60
3.3. iPSC-MSCs 培养及鉴定		64
3.3.1.	iPSC-MSCs 培养形态学观察	64
3.3.2.	iPSC-MSCs 免疫表型检测	65
3.3.3.	iPSC-MSCs 向成骨细胞诱导分化	66
3.3.4.	iPSC-MSCs 向脂肪细胞诱导分化	66

3.3.5. iPSC-MSCs 向内皮细胞诱导分化.....	67
3.3.6. 小结.....	67
3.4. iPSC-MSCs 联合低剂量 Rapa 诱导胰岛移植耐受.....	68
3.4.1. iPSC-MSCs 联合低剂量 Rapa 诱导同种异体胰岛免疫耐受.....	69
3.4.2. iPSC-MSCs 抑制 T 细胞增殖.....	70
3.4.3. iPSC-MSCs 对脾脏中 T 细胞亚群的比例变化的影响.....	72
3.4.4. iPSC-MSCs 诱导调节性 T 细胞产生来保护同种异体胰岛移植.....	73
3.4.5. iPSC-MSCs 对血清中细胞因子的影响.....	74
3.4.6. iPSC-MSCs 对移植部位细胞因子 mRNA 相对表达量的影响.....	75
3.4.7. iPSC-MSCs 保护同种异体胰岛移植并减少炎细胞浸润.....	76
3.4.8. 小结.....	78
第四章 结论与展望.....	80
4.1. 结论.....	80
4.1.1. 胰岛移植逆转糖尿病对小鼠卵母细胞造成的损伤.....	80
4.1.2. iPSC-MSC 诱导联合低剂量 Rapa 同种异体胰岛移植耐受.....	81
4.2. 展望.....	82
参考文献.....	83
附录.....	100
附录一：图表索引.....	100
附录二：缩略语及中英文对照.....	102
附录三：攻读博士期间发表和待发表的学术论文.....	104
致 谢.....	105

Table of Contents

Chinese Abstract	I
English Abstract.....	III
Chapter 1 Introduction	1
1.1. Diabetic complications and its effects on reproduction.....	1
1.1.1. Diabetic complications	1
1.1.2. Effects of diabetes on reproduction	2
1.2. Diabetes therapy	4
1.2.1. Insulin treatment	4
1.2.2. Pancreas transplantation	5
1.2.3. Islet transplantation.....	6
1.3. Current problems of islet transplantation.....	8
1.3.1. The sources of islets.....	8
1.3.2. Immunologic rejection after islet transplantation	9
1.4. Mesenchymal stem cells	12
1.4.1. The immunogenicity of MSCs.....	12
1.4.2. The immunomodulatory effects of MSCs	13
1.4.3. The immunoregulatory mechanism of MSCs.....	16
1.5. Mesenchymal stem cells in organ transplantation.....	18
1.5.1. MSCs in experimental models of solid organ transplantation.....	18
1.5.2. MSCs in clinical transplantation.....	20
1.5.3. iPSC-MSCs.....	21
1.6. Purpose, significance and contents	21
Chapter 2 Materials and Methods.....	23
2.1. Materials	23
2.1.1. Animals.....	23
2.1.2. Main reagents	23
2.1.3. Main instruments	25
2.2. Methods	26
2.2.1. Mouse islet transplantation model.....	26

2.2.2.	Drug treatments	28
2.2.3.	Oocyte experiment methods	30
2.2.4.	Morphology and multiple differentiation potential of iPSC-MSCs	31
2.2.5.	Cellular immunology methods	34
2.2.6.	Molecular biology methods	39
2.2.7.	Statistical analysis.....	45
Chapter 3 Results and discussion.....		46
3.1.	Effects of diabetes on oocyte maturation.....	46
3.1.1.	Effect of diabetes on number of ovulated oocytes.....	46
3.1.2.	Effect of diabetes on spindle morphology of ovulated oocytes.....	47
3.1.3.	Effect of diabetes on incidence of aneuploidy in ovulated oocytes.....	49
3.1.4.	Effect of diabetes on the relative expression of <i>Mad2</i> and <i>Bub1</i> of ovulated oocytes.....	51
3.1.5.	Effect of diabetes on the embryo development after parthe-nogenetic activation of mouse oocytes.....	52
3.1.6.	Summary of this part	52
3.2.	Effects of islet transplantation on oocyte maturation of diabetic mice...55	
3.2.1.	Effect of islet transplantation on the weight and blood glucose of diabetic mice	55
3.2.2.	Effect of islet transplantation on the number of ovulated oocytes of diabetic mice	56
3.2.3.	Effect of islet transplantation on spindle morphology of ovulated oocytes of diabetic mice.....	57
3.2.4.	Effect of islet transplantation on incidence of aneuploidy of ovulated oocytes of diabetic mice.....	58
3.2.5.	Effect of islet transplantation on the relative expression of <i>Mad2</i> and <i>Bub1</i> of ovulated oocytes of diabetic mice	59
3.2.6.	Effect of islet transplantation on embryo development after parthe-nogenetic activation of ovulated oocytes of diabetic mice	60
3.2.7.	Summary of this part	60
3.3.	Culture and identification of iPSC-MSCs.....	64
3.3.1.	Morphology of iPSC-MSC	64
3.3.2.	Immunophenotype of iPSC-MSCs	65
3.3.3.	Osteogenesis of iPSC-MSCs	66
3.3.4.	Adipogenesis of iPSC-MSCs.....	66
3.3.5.	Differentiation of iPSC-MSCs into endothelial cells	67

3.3.6. Summary of this part	67
3.4. iPSC-MSCs combined with low-dose Rapa induce tolerance of islet allograft.....	68
3.4.1. The survival of islet allotransplantation with treatment of iPSC-MSCs	69
3.4.2. The immunosuppressive effect of iPSC-MSCs on T lymphocyte proliferation.....	70
3.4.3. The proportion of CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T lymphocytes after transplantation and treatments	72
3.4.4. The protective effect of iPSC-MSCs on islet allograft through the induction of Treg.....	73
3.4.5. Effects of iPSC-MSCs on the expression of cytokines in serum.....	74
3.4.6. Effects of iPSC-MSCs on the relative expression of cytokine mRNA in graft	75
3.4.7. The preservation of islet graft and the infiltration of inflammatory cell after treatment of iPSC-MSCs	76
3.4.8. Summary of this part	78
Chapter 4 Conclusion and Prospect.....	80
4.1 Conclusion	80
4.1.1. Islet transplantation reverses the effects of maternal diabetes on mouse oocytes	80
4.1.2. iPSC-MSCs combined with low-dose Rapa induce tolerance of islet allograft.....	81
4.2. Prospect	82
References.....	83
Appendices	100
Figure index.....	100
Abbreviations	102
My Publication	104
Acknowledgments.....	105

摘要

目的： I 型糖尿病孕妇在怀孕期间面临严重的生殖问题，如不育、流产、胎儿先天发育异常等等。越来越多证据表明糖尿病对胚胎的这种影响可能是由于母体的高糖环境影响到卵母细胞成熟造成的。胰岛移植是否可以逆转糖尿病对胚胎和卵母细胞成熟造成的影响、能否通过辅助干细胞治疗的方法降低胰岛移植中使用的免疫抑制剂对胚胎和卵母细胞成熟造成的影响等一系列问题需要进行系统的研究。为了解决这些问题，本文首先系统研究糖尿病对胚胎和卵母细胞成熟造成的影响；其次创新性的对比研究了胰岛素注射和胰岛移植逆转糖尿病对胚胎和卵母细胞成熟造成的影响的作用；最后，针对胰岛移植中免疫抑制剂对卵母细胞和胚胎的副作用，研究 iPS 诱导的 MSCs (induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells, iPSC-MSCs) 辅助胰岛移植是否可以彻底逆转糖尿病，保护卵母细胞免受高血糖和免疫抑制剂的危害。

方法： (1) 我们分别从小鼠卵母细胞核成熟、胞质成熟、孤雌胚胎发育等方面来探究糖尿病对卵母细胞造成影响。(2) 为了探究胰岛移植能否逆转糖尿病对卵母细胞造成的损伤，我们采用了同种同基因胰岛移植，从小鼠卵母细胞成熟相关的多项指标进行探究，并与胰岛素注射组进行了比较。(3) 为了验证 iPSC-MSCs，我们采用流式细胞术检测 iPSC-MSCs 表型，并诱导 iPSC-MSCs 向成骨细胞、脂肪细胞及内皮细胞分化。(4) 为了研究 iPSC-MSCs 辅助胰岛移植是否可以彻底逆转糖尿病，我们采用同种异体胰岛移植排斥模型，再联合临床一线药物 Rapa 给药治疗，观察移植物生存期的改变，并探讨其可能的作用机制。

结果： (1) 跟对照组相比，糖尿病小鼠卵母细胞排卵量减半、纺锤体异常和染色体异常比例增加、非整倍体率增加、*Mad2* 和 *Bub1* mRNA 相对表达显著增加、孤雌激活囊胚率明显增加。(2) 胰岛移植使卵母细胞各项成熟指标均恢复正常，但胰岛素注射不能。(3) iPSC-MSCs 形态呈成纤维细胞样、并高表达

CD73、CD90、CD105，不表达 CD45、CD34、CD14。P18 iPSC-MSCs 仍具有多项分化功能，可以向成骨细胞、脂肪细胞、内皮细胞分化。（4）生存期数据表明单独使用 iPSC-MSCs 不能明显延长胰岛生存期，但联合低剂量 Rapa 可诱导移植物耐受，彻底逆转了糖尿病。联合组 T 细胞受到最明显的抑制作用。我们分别从蛋白水平和分子水平对血清及移植物中各类细胞因子进行检测，结果发现 Th1、Th17 类细胞因子受到抑制，Th2、Treg 类细胞因子高表达，这说明 iPSC-MSCs 与 Rapa 联合用药的作用机制是调节 Th1/Th2、Treg/Th17 平衡。

结论：糖尿病影响小鼠卵母细胞核成熟、胞质成熟以及孤雌胚胎发育能力，其可能机制是通过影响纺锤体检测点 *Mad2* 和 *Bub1* mRNA 的表达；并首次证实胰岛移植可以彻底逆转糖尿病对卵母细胞造成的损伤，并且治疗效果优于胰岛素注射。我们研究发现 iPSC-MSCs 与 Rapa 通过调节 Th1/Th2、Treg/Th17 平衡来诱导胰岛移植物耐受，并且降低了 Rapa 的使用剂量。总之，使用细胞免疫耐受策略的胰岛移植是避免 I 型糖尿病引起女性生殖问题的有效途径。

关键词：卵母细胞；胰岛移植；iPSC-MSCs

Abstract

Objective: Women with poorly controlled type 1 diabetes often suffer from a series of reproductive problems such as miscarriage, neonatal morbidity and mortality, and congenital malformations. Maternal hyperglycemia has been shown to adversely affect progression from a one-cell to a blastocyst stage in rodent models. Emerging evidence has implicated that these effects are associated with compromised oocyte maturation. Whether islet transplantation could reverse the effects of diabetes on mouse oocytes maturation and whether stem cell therapy could reduce the effects of immunosuppressants on mouse oocyte maturation remain further systematically investigated. To address those issues, we first investigated the effects of diabetes on mouse oocyte maturation and tried to explore its possible mechanism based on previous studies; second we carried out a innovation research to compare the effects of islet transplantation on diabetic mouse oocyte maturation with insulin treatment; and finally direct at the side-effects of immunosuppressants on oocyte and embryo maturation, we investigated the efficacy of iPS-MSC-based therapy in reversion of comprised oocyte maturation caused by hyperglycemia and immunosuppressants in diabetes.

Materials and methods: (1) We have utilized a streptozotocin-induced diabetic mouse model to examine the effect of maternal diabetes on nuclear maturation, cytoplasmic maturation and parthenogenetic embryo development of mouse oocytes. (2) In order to investigate whether islet transplantation could reverse the effects of diabetes on mouse oocyte maturation, a number of oocyte maturity indexes were investigated using islet syngraft, and we compared the therapeutic effect of islet transplantation with insulin treatment. (3) iPS-MSCs were tested for their phenotypes. Adipogenesis, osteogenesis and endothelial-cells differentiation of iPSC-MSCs were carried out. (4) To elucidate whether iPSC-MSCs alone, or in combination with short-term Rapa treatment, could reverse diabetes, we used islet allograft to explore their effects on graft survival and further investigated the possible molecular mechanisms underlying the immunomodulatory properties of iPSC-MSCs.

Results: (1) Diabetic mice ovulated about one half as many ova as controls. We also found that a high frequency of spindle defects and chromosome misalignment, a

significant increase in the incidence of hyperploidy, a higher relative expression of *Mad2* and *Bub1* and a higher rates for blastocyst formation were observed in ovulated MII oocytes from diabetic mice, compared to the control MII oocytes. (2) our results suggested islet transplantation could reverse effects of maternal diabetes on oocytes maturity indexes, while insulin treatment could not. (3) P18 iPSC-MSCs displayed a typical spindle fibroblast-like pattern. Flow cytometry analysis revealed the iPSC-MSCs were positive for CD73, CD90, and CD105 and negative for CD45, CD34 and CD14 surface molecules. P18 iPSC-MSCs could differentiate to osteoblasts, adipocytes, and endothelial cells in vitro. (4) Our results showed that iPSC-MSCs treatment alone had no significant effect on allograft survival of islet grafts. However, iPSC-MSCs combined with short-term Rapa significantly prolonged graft survival, even achieved tolerance. The proliferation of T lymphocyte isolated from spleen of combination group was suppressed significantly in vitro. Though examining cytokines in protein and gene levels, we noticed the expression of Th1 and Th17 cytokines were inhibited while the expression of Th2 and Treg cytokines were enhanced. Our results suggested that iPSC-MSCs combined with short-term Rapa regulated Th1/Th2 and Th17/Treg cells balance.

Conclusion: Our results revealed that maternal diabetes induced compromised nuclear maturation, cytoplasmic maturation and parthenogenetic embryo development of mouse oocytes and its mechanism may be the regulation of the spindle checkpoint *Mad2* and *Bub1* mRNA expression; we confirmed for the first time that islet transplantation prevented prevent these detrimental effects and was better than insulin treatment in therapeutic effect. Besides, our results indicated that iPSC-MSCs infusion synergized with low-dose immunosuppressants in inducing long-term islet graft acceptance through reciprocal regulation of Th1/Th2 and Th17/Treg cells. Our results indicated that these cells allow safe minimization of maintenance pharmacological antirejection therapy and thus reduced the effects of immunosuppressants on oocyte maturation. It is concluded that islet transplantation combined with stem cell therapy is an effective method to avoid the reproductive damages for women with diabetes mellitus.

Keywords: oocyte; islet transplantation; iPSC-MSCs.

第一章 前言

1.1. 糖尿病并发症及其对生殖系统的影响

1.1.1. 糖尿病并发症

糖尿病是一种严重危害人类健康的慢性内分泌代谢性疾病。2004 年，估计有 340 万人死于空腹高血糖^[1]。截止到 2011 年全世界有 3.47 亿糖尿病患者^[2]。世卫组织预测，2030 年糖尿病将成为第七位主要死因^[3]。糖尿病可以分为多种类型，其中 1 型糖尿病以 T 淋巴细胞介导的胰岛 β 细胞损伤为主要特征，最终使胰岛素分泌绝对缺乏从而导致血糖的持续升高，是一种自身免疫性疾病^[4]。其特征表现为：①抗胰岛细胞抗体的存在(目前是诊断 1 型糖尿病的最佳标准)；②胰岛素的严重缺乏；③胰岛 β 细胞被自身免疫破坏^[5]。尽管 1 型糖尿病患者只占世界糖尿病人口约 10%，但因糖尿病发病率持续增长^[6]，它成为主要的全球性健康问题之一。

高血糖在短期内可引起易渴、多尿、易饿及体重减轻方面的症状。但在较长时间内，会引起微血管并发症和大血管并发症。微血管病变主要引起糖尿病视网膜病、糖尿病肾病、糖尿病神经病变、糖尿病足等。糖尿病性视网膜病是失明以及视觉残疾的一个主要病因。它是由眼睛后侧层，也就是视网膜的小血管受损而引起的，导致视力逐步丧失，甚至失明。糖尿病肾脏疾病也是由于肾脏的小血管受损引起的。该病可以引起肾衰并且最终导致死亡。糖尿病可通过不同的机制使神经受损，包括高血糖引起的直接损害以及通过小血管受损而使流向神经的血液减少。这类神经损害可造成感觉丧失，肢体受损以及在患有糖尿病的男性中出现阳痿。这是糖尿病最为常见的并发症。糖尿病足是由于血管和神经方面的变化引起的，该病往往会造成溃疡以及随后出现的截肢，它是由血管和神经疾病过程造成的。糖尿病大血管病变会引起心血管疾病，如心脏病发作、中风以及腿部血流不足等。高血糖主要是通过一种称为“动脉粥样硬化”的病程或者血管阻塞而使血管受损。这类动脉狭窄可使流向心肌（引起心脏病发作）、或者大脑（引起中风）或者肢端（引起疼痛以及感染愈合减慢）

的血液减少。这些并发症是糖尿病患者致残或致死的主要原因。因此，如何延缓糖尿病并发症病的发生和发展，具有十分重要的研究意义。

1.1.2. 糖尿病对生殖系统的影响

1.1.2.1. 糖尿病对胚胎发育的影响

糖尿病不仅会引起微血管、大血管病变，还会影响胚胎发育。哺乳动物胚胎在植入到子宫内膜前很容易受到损伤，并进而引起早期胚胎流产、胚胎吸收及畸形^[7]。丙酮酸和乳酸通过氧化磷酸化作用为植入前胚胎提供主要能量。当胚胎由输卵管进入到无氧的子宫环境中，通过糖酵解方式来获得能量^[8]。母体高糖影响啮齿类动物胚胎从单细胞到囊胚的发育进程^[9-13]。利用链脲菌素（Streptozotocin, STZ）诱导糖尿病小鼠模型，观察糖尿病对胚胎体内发育的影响。人体绒毛膜促性腺激素（human chorionic gonadotropin, hCG）注射 48h 后，糖尿病小鼠二细胞胚胎发育延迟并且发育率明显降低^[9]。同样地，在体外试验中高糖环境下培养的二细胞胚胎与在正常培养基条件下相比也发育延迟^[14]。

值得注意的是，跟正常鼠相比，从糖尿病小鼠获得的二细胞胚胎在体外向囊胚发育延迟^[9]。Vesela 等发现从糖尿病大鼠获得的二细胞胚胎约有 50%不能发育到八细胞期，即使在非糖尿病鼠子宫内^[15]。上述结果表明，即便胚胎只是很短的时间内暴露在糖尿病环境中，对后续胚胎的发育仍具有持续的影响。另外，通过对单细胞胚胎进行微量分析，Moley 等发现高糖可诱导小鼠囊胚期葡萄糖转运蛋白表达下调，降低葡萄糖摄取量，进而降低胚胎内葡萄糖水平^[7, 11]。葡萄糖转运减少，会诱导囊胚凋亡^[16, 17]。除此之外，糖尿病大鼠破碎胚胎的数目增加，囊胚内细胞团细胞数量减少^[10]。原因可能是高糖通过细胞死亡效应途径诱导胚胎凋亡^[18, 19]。在葡萄糖诱导凋亡的囊胚中三羧酸循环代谢异常，表明线粒体功能发生异常^[20]。将糖尿病鼠的单细胞受精卵转移到非糖尿病鼠体内后，子代仍具有较高的先天异常率及生长延迟率^[21]，表明在卵子发生、受精过程中，暴露于糖尿病中 24h 足以使胚胎形态等发生变化。除此之外，糖尿病小鼠卵巢类固醇生成降低^[22, 23]，颗粒细胞凋亡增加^[24]，以及卵母细胞发育延迟^[9, 25]。根据以上结果可以推测母体糖尿病的损伤最早可追溯到卵母细胞时期，并且卵母细胞受到的损伤会引起后代受精后胚胎发育异常甚至代谢疾病。

1.1.2.2. 糖尿病对卵母细胞发育的影响

对于大多数哺乳动物来说，出生时卵母细胞停滞在第一次减数分裂前期的双线期，也就是生发泡（germinal vesicle, GV）期，直到性成熟。青春期时，在脑垂体促黄体激素的作用下卵母细胞开始发育，表现为生发泡破裂（germinal vesicle breakdown, GVBD），微管组装成双极性的纺锤体，并且所有染色体排列在纺锤体赤道板上，卵母细胞进入中期 I（metaphase I, MI），向卵周隙中排出第一极体随后，进入第二次减数分裂，并停滞在中期 II（metaphase II, MII）^[26, 27]。卵母细胞的完全发育需要核成熟与胞质成熟同步进行^[28]。卵母细胞成分的异位、功能异常，如纺锤体、皮质颗粒细胞或线粒体，均可影响卵母细胞的质量^[29-31]。越来越多证据表明卵母细胞质量对受精、早期胚胎存活、妊娠维持、胚胎发育甚至成人疾病具有极其深刻的影响^[28, 32]。因此，探究母体糖尿病对卵母细胞质量的影响有利于我们深入了解糖尿病妇女生殖疾病的起源。

GVBD 可作为卵母细胞成熟的一个标记。Diamond 等第一次报道超数排卵处理后的糖尿病小鼠 GVBD 率降低，随后又有许多相关研究证实了这一点。尽管如此，值得注意的是糖尿病小鼠的卵丘细胞卵母细胞复合体（cumulus-oocytes complexes, COCs）体外自发成熟加速，激素诱导成熟延迟。糖尿病小鼠卵母细胞诱导排卵后很难达到 MII 期^[25]。体外数据表明葡萄糖对卵母细胞减数分裂的促进或抑制作用是由间隙连接信号通路介导的^[33, 34]。研究发现，跟对照组相比，糖尿病小鼠卵母细胞与卵丘细胞的细胞间作用减弱^[25]，并且间隙连接蛋白 Cx26 和 Cx43 表达也显著降低。另外，Cx37 是一种主要表达于卵母细胞上的间隙连接蛋白，其在糖尿病卵母细胞中的表达量也显著降低^[24, 35]。体外将 COCs 与一间隙连接阻断剂甘珀酸共孵育，结果小鼠卵母细胞 GVBD 显著被延迟^[35]，尽管破坏大鼠卵泡间隙连接信号通路反而促进卵母细胞成熟^[36]。因此，间隙连接及连接蛋白表达降低，很有可能是糖尿病卵母细胞发育受损的原因。

另外，糖尿病鼠 COCs 和卵母细胞中均发现葡萄糖、嘌呤和 cAMP 代谢、羟烷基-CoA 脱氢酶、谷氨酸丙酮酸氨基转移酶和 AMP 活化蛋白激酶活性均受损^[25, 37, 38]。糖尿病大鼠正常排出的卵母细胞、从卵巢中获取的不成熟的 COCs 以及体外成熟 COCs 中前列腺素 E2（Prostaglandin E2, PGE-2）均表达异常^[39, 40]。这些也被认为是糖尿病动物卵母细胞减数分裂异常的原因。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

廈門大學博碩士論文摘要庫