

牛卵巢腔前卵泡的机械分离试验

周欢敏 张 涌 王新庄

(西北农业大学发育生物学研究室,陕西杨凌 712100)

摘 要 机械方法处理胎牛、犊牛和成年牛卵巢可以获得大量的腔前卵泡。胎牛卵巢用眼科手术剪刀剪碎 (M_1)或用组织切碎机切碎 (M_2),犊牛和成年牛卵巢用组织切碎机切碎,经悬浮吹打和过滤,平均每只卵巢可获得腔前卵泡胎牛为 3 282(M_1)和 5 688(M_2),犊牛为 2 100,成年牛为 3 52。在所分离的胎牛和犊牛卵巢卵泡中原始卵泡和初级卵泡占绝大部分,而成年牛卵巢卵泡主要是初级卵泡和次级卵泡。不论是胎牛、犊牛或成年牛,从其所分离的绝大部分腔前卵泡外观质量完好。

关键词 牛卵巢,腔前卵泡,机械分离

中图分类号 S814.1, S823.811

牛在 4 岁以前其卵巢内腔前卵泡多达十几万,但能达到排卵前阶段者不足 1%,其余都在发育过程中闭锁退化^[1]。拯救和利用牛这一潜在的种质资源具有重要的实用价值,而有效地将腔前卵泡分离出来是体外培养利用的重要研究内容之一。

链霉蛋白酶^[2]、胰蛋白酶^[3]、胶原蛋白酶和透明质酸酶及脱氧核糖核酸酶已用于哺乳动物卵巢各级卵泡的分离^[4-6]。酶消化和机械处理相结合分离卵泡在研究中被广泛采用^[7,8]。研究表明酶处理往往对卵泡产生有害的副作用,势必会给卵泡的体外培养造成不利的影响,特别是在卵泡数量有限的情况下,影响实验结果的可靠性。机械分离卵泡可以避免酶处理的不足,保持所分离的卵泡结构的完整性和卵泡的质量。本试验采用机械分离法就胎牛、犊牛和成年牛的卵巢卵泡的分离效果进行了研究

1 材料和方法

卵巢来源 牛卵巢来自当地屠宰场

卵巢处理 动物屠宰后,手术摘除卵巢,置于 35~39℃ 的生理盐水内 ($3.334 \mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ 的青霉素和 $3.334 \mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ 的链霉素)于 4 h 内运回实验室

卵泡分离 将卵巢用生理盐水冲洗干净,除掉卵巢表面结缔组织和脂肪组织,于生理盐水中冲洗 2~3 遍。然后沿卵巢门纵向将卵巢切成两半,用眼科手术剪刀除去卵巢髓质部分,再置于 MEM 培养液中洗涤 2~3 遍。胎牛卵巢采用两种方法处理,即:将卵巢于培养皿 (H6 cm) 中用眼科手术剪刀剪碎 ($H \leq 1 \text{ mm}$),或于组织切碎机 (McIlwain tissue chopper, The mickle laboratory engineering Co. Ltd. United Kingdom) 上切碎 ($H400 \mu\text{m}$)。犊牛和成年牛卵巢用组织切碎机切碎 ($H400 \mu\text{m}$)。置组织碎块于培养皿中,加适量

收稿日期 1997-09-30

课题来源 农业部生物技术重点项目

作者简介 周欢敏,男,1959 年生,副教授,博士

培养液,以直径略大于组织块的细吸管充分悬浮吹打。然后将悬浮液过滤(网孔 $H500\ \mu\text{m}$),将过滤液收集于 $10\ \text{mL}$ 离心管中离心 ($1\ 000\ \text{r/min}$) $2\sim 3\ \text{min}$,去上清液,再重复离心 1 次。将沉淀物用细吸管尖部轻轻吹打,移入培养皿,加适量培养液混匀,静置 $3\sim 5\ \text{min}$ 后拣卵,最后计数并分类。

2 结 果

2.1 卵巢分离的腔前卵泡数量分布(图 1)

两种机械程序分离胎牛卵巢均获得大量不同发育阶段的腔前卵泡(表 1),采用第二种程序(M_2)比第一种程序(M_1)处理卵巢组织分离卵泡更有效,而犊牛和成年牛卵巢用组织切碎机处理才便于卵泡的分离,并获得大量的腔前卵泡。从胎牛和犊牛卵巢分离的卵泡数量要远远多于成年牛。

表 1 牛卵巢分离的腔前卵泡平均数

| 项目 | 胎 牛 | | 犊 牛 | 成年牛 |
|-----|-------|-------|------|-----|
| | M_1 | M_2 | | |
| 卵巢数 | 6 | 6 | 6 | 10 |
| 卵泡数 | 3282 | 5688 | 2100 | 352 |

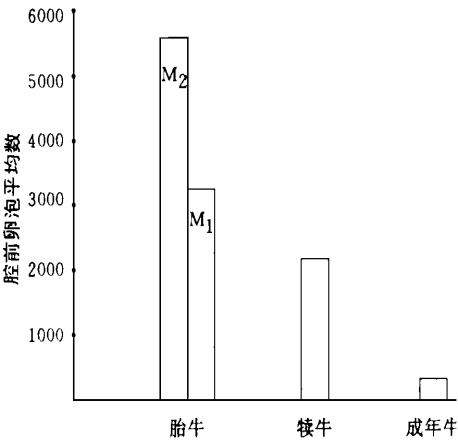


图 1 胎牛、犊牛和成年牛卵巢腔前卵泡的数量分布

2.2 卵巢分离的腔前卵泡构成特征(图 2)

从胎牛卵巢获得的腔前卵泡包括原始卵泡、初级卵泡和次级卵泡。在所分离的卵泡中原始卵泡和初级卵泡占绝大部分。镜下有时能观察到正处于分裂相的合体卵原细胞。犊牛和成年牛卵巢腔前卵泡以初级卵泡和次级卵泡为主。在所分离的各级卵泡中能观察到裸卵的存在(图 2D)。从胎牛卵巢分离的卵泡比犊牛和成年牛的多,成年牛最少。

2.3 分离的腔前卵泡外观质量

从胎牛、犊牛和成年牛卵巢分离出来的正常腔前卵泡外观呈圆形或卵圆形,卵泡外围有一层结构完整的膜,膜下颗粒细胞排列紧密。颗粒细胞层数较少的卵泡,其卵母细胞清晰可见,位于卵泡的中间或略偏于一侧,镜下表现为圆而透亮,胞质均匀。颗粒细胞层数较多的卵泡镜下看不清卵母细胞,而其颗粒细胞密而紧凑,紧紧包围着卵母细胞,其外周与膜紧密相连,外观光洁明亮均质。在分离的各级卵泡中,绝大部分属正常形态,这正符合目前公认的腔前卵泡的形态学质量标准。

3 分析和讨论

实验结果表明眼科手术剪刀和组织切碎机处理胎牛卵巢均可分离得腔前卵泡,而且后者比前者的分离效果更好(表 1),其所得卵泡数约多三分之二。显然组织切碎机要比手术剪刀切得组织块均匀一致,有利于卵泡的分离。后者切得组织块小也是重要原因之一。对于犊牛和成年牛卵巢只采用组织切碎机处理,也获得大量的腔前卵泡。多次预实验发现,由于犊牛卵巢韧性大,眼科手术剪刀剪切效果不理想,处理成年牛卵巢更加困难。

从纵向比较看,虽然从不同来源的卵巢能获得大量的腔前卵泡,但卵巢组织的结缔组织纤维化程度是影响分离的重要因素之一。随着动物年龄的增加,卵巢组织的纤维化程度增加,其韧性就加大,不易使卵泡从组织包围中脱离出来,所分离的卵泡数随之减少。这一结果和 Figueiredo 等的报道相一致^[9]。在分离卵泡的过程中发现,胎牛卵巢中的结缔组织几乎没有,胎龄越小间质组织越少,甚至撕碎卵巢组织卵泡就释放出来。切割的组织块中卵泡呈团状。犊牛和成年牛卵巢特别是后者,结缔组织极为丰富,镜下观察不到上述现象。

实验证实,分离程序的每一环节都影响到卵泡分离的效果。切碎后的卵巢组织块只有经过直径合适的细吸管充分悬浮和吹打,并再通过橡皮刮挤压和过滤,才能使卵泡尽可能多地分离出来。特别是成年牛卵巢,如果不进行上述处理,几乎分离不出腔前卵泡。即使是胎牛和犊牛其卵泡的分离数量也因此而锐减。本研究虽未对所分离的卵泡的裸卵进行计数,但镜下观察从成年牛卵巢分离的卵泡其裸卵数明显高于胎牛和犊牛。造成这一结果的原因可能是成年牛的卵巢结缔组织纤维丰富,韧性大,组织碎块又多,在分离过程各个步骤引起卵泡膜破裂和颗粒细胞的脱落。

本研究表明,实验中还发现不同来源的卵巢(胎牛、犊牛和成年牛)所分离的腔前卵泡数在个体间存在相当大的差别。来自屠宰场的卵巢,胎牛的胎龄,犊牛和成年牛的年龄,品种及其生理状态有很大的不同,势必出现卵泡数量在个体间的差异。尽管卵巢组织碎块经过若干步骤的处理,但其中仍存留一部分卵泡,所分离的卵泡和卵巢中固有的卵泡数相比差之甚远。但与前人的同类研究结果^[9]相比,本研究所分离的腔前卵泡数与之相当,甚至还要多。但分离程序简单,作为卵泡培养之用的取卵方法是可取的。

分离腔前卵泡的目的是用于体外培养的各种研究,在要求足够数量的同时更要求其完好的质量。在建立腔前卵泡分离方法时,要考虑到数量和质量之间达到平衡,以保证研究结果的可靠性。许多研究者采用酶消化法分离动物的腔前卵泡,这种方法也可以获得大量卵泡,但在卵泡的分离过程中不但耗时,而且费用较高,同时一旦掌握不好酶的浓度、消化时间和酶的纯度以及消化温度等,都会影响到卵泡的质量^[10,11],而简单易行的机械分离法则避免了这一不足。

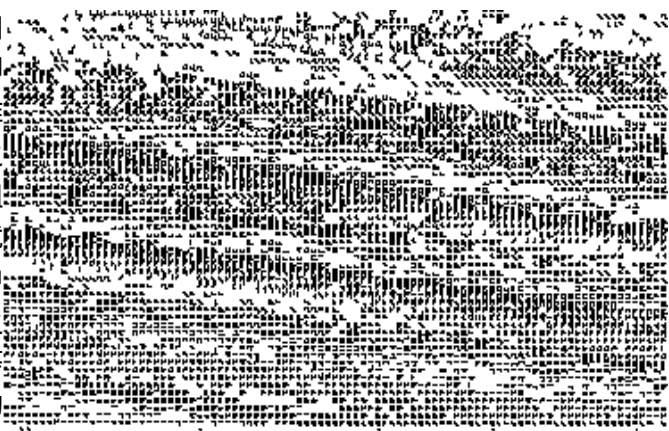


图 2 牛不同发育阶段的腔前卵泡

A. 胎牛卵巢的原始卵泡和初级卵泡($\times 200$);

B. 犊牛卵巢的次级卵泡($\times 400$)

C. 成年牛卵巢的大次级卵泡($\times 400$); D. 裸卵($\times 200$)

参 考 文 献

- 1 Erickson B H. Development and senescence of the post natal bovine ovary. J Anim Science, 1996, 25 800~ 805
- 2 Grob M S. Enzymatic dissection of the mammalian ovary. Science, 1964, 146 73~ 74
- 3 Maresh G A, Timmons T T, Dunbar B D. Effects of extracellular matrix on the expression of specific ovarian proteins. Biology of Reproduction, 1990, 43 965~ 976
- 4 Morbeck D E, Flowers W L, Britt J H. Response of porcine granulosa cells isolated from primary and secondary follicles to FSH, 8-bromo-cAMP and epidermal growth factor in vitro. J Reprod Fertil, 1993, 99 377~ 384
- 5 Roy S K, Greenwald G S. An enzymatic method for dissociation of intact follicles from the hamster ovary: histological and quantitative aspects. Biology of Reproduction, 1985, 32 203~ 215
- 6 Greeneald G S, Moor R M. Isolation and preliminary characterization of pig primordial follicles. J Reprod Ferti, 1989, 87 566~ 571
- 7 Cain L, Chatterjee S, Collins T J. In vitro folliculogenesis of rat preantral follicles. Endocrinology, 1995, 136 3369~ 3377
- 8 Torrance C, Telfer E, Gosden R G. Quantitative study of the development of isolated mouse pre-antral follicles in collagen gel culture. J Reprod Ferti, 1989, 87 367~ 374
- 9 Figureiredo J R, Hulshof S C J, Van den Hurk R, et al. Development of a combined new mechanical and enzymatic method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries. Theriogenology, 1993, 40 789~ 799
- 10 Poste G. Adsorption and activity of enzymes at the cell surface: Tissue dissociation with proteolytic enzymes. Exp Cell Res, 1971, 65 359~ 367
- 11 Gavanaugh D J, Berndt W O, Smith T E. Dissociation of heart cells by collagenase. Nature, 1963, 19 261~ 262

Mechanical Isolation of Preantral Follicles in Bovines

Zhou Huanmin Zhang Yong Wang Xinzhuang

(Research Section of Development Biology, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract A large number of preantral follicles had been obtained by mechanical procedure from bovine fetuses, calves and cows. The ovaries of fetuses were cut into small pieces ($\leq 1\text{mm}$) with both an optical scissors (M1) and a tissue chopper (M2), and ovaries of calves and cows were cut with a tissue chopper. Then the suspensions of ovarian fragments were suspended and filtered. The mean numbers of preantral follicles isolated from each ovary of fetuses, calves and cows were 3282 (M1) and 5688 (M2), 2100 and 352 respectively. The vast majority of the ovarian follicles isolated from fetus and calf ovaries consisted of primordial follicles and primary follicles, and mainly primary and secondary follicles from cow ovaries, most of which had good quality.

Key words bovine ovary, preantral follicle, mechanical isolation