

哺乳动物腔前卵泡的体内和体外发育

周欢敏 张 涌

(西北农业大学发育生物学研究室,陕西杨凌 712100)

摘 要 对哺乳动物包括啮齿类和家畜等卵巢腔前卵泡体内和体外发育,近几年的研究结果进行分析,认为哺乳动物卵巢腔前卵泡体内的发育模式基本相似,但不同动物又具有各自的特点。腔前卵泡在合适的培养条件下能在体外发育并成熟,促性腺激素和生长因子等在其体外发育过程中具有调节作用。发育过程中卵泡质量的鉴定和卵母细胞标准的确定及培养体系的建立是该领域需要解决的问题。

关键词 哺乳动物,腔前卵泡,体内发育,体外发育

分类号 Q959.804

哺乳动物卵巢含有数十万个卵泡,这些卵泡绝大部分是以无腔的形式存在的,然而能发育到成熟并排卵的卵泡为数甚少,约 90% 以上的卵泡在腔前阶段退化闭锁,这无疑为动物遗传与繁育资源的极大损失。腔前卵泡的体内和体外发育的研究有助于揭示卵泡发育的过程及其机制,对于挽救和利用这一宝贵的资源具有重要的理论和实践意义。

1 卵泡的体内发生

1.1 原生殖细胞的早期发生

关于哺乳动物的原生殖细胞的来源一直是胚胎学家和生物学家探索的热点之一。曾在 50 年前,研究人员发现小鼠在交配后 8 d,原生殖细胞首次出现在卵黄囊内胚层,后随后肠形成迁移到后肠内胚层。最新研究表明,小鼠在交配后 7 d,原肠中期其原生殖细胞就出现在原条后端的胚外中胚层,后随原条细胞内卷到达卵黄囊背侧的内胚层^[1]。通过对碱性磷酸酶染色发现有 8 个原生殖细胞存在于原条后端的胚外中胚层,如果在培养 7 d 将原生殖细胞区切除,则 48 h 后胚胎缺乏原生殖细胞。经追踪发现原生殖细胞从 8.5 d 开始迁移,经背肠系膜迁移到中肾腹侧的生殖嵴^[2]。原生殖细胞的数量变化表明,在迁移的过程中不断分裂,其数量逐渐增加,当到达生殖嵴时,原生殖细胞可达 4 000 多个,到交配后的 13.5 d,达到 2.6 万个。原生殖细胞除了具有迁移能力,还具有形态变化的能力,除产生变形虫状的伪足之外,其表面还存在特异的表面糖结合物,一旦到达生殖嵴,这种物质即行消失^[2],看来这种物质与其迁移能力有关。体外培养原生殖细胞的实验结果表明,原生殖细胞具有趋化性。生殖嵴对原生殖细胞有一种趋化作用^[3],生殖嵴释放出的某种因子能吸引原始生殖细胞,远距离控制其运动方向和范围,甚至还能影响其形态,如形成叶状突起和伸出伪足。目前对趋化作用的性质尚不完全清楚,但实验表明,性腺产生的 TGF-

收稿日期 1997-09-03

课题来源 农业部生物技术重点项目,95 牧-01-04-01

作者简介 周欢敏,男,1959 年生,副教授,博士

U (Transforming growth factor-U) 是调节原生殖细胞的趋化性的因子之一,但在体外 TGF-U 却抑制 8.5 d 小鼠胚胎的原生殖细胞的增殖,说明在其迁移通过背侧中胚层时,还有其他因子调节原生殖细胞的增殖^[4]。TGF-U 不是直接调节原生殖细胞的迁移,原生殖细胞迁移的方向是由背肠系膜中的纤连蛋白决定的,当其迁移到生殖嵴后,背肠系膜中的纤连蛋白的含量减少或消失,而背肠系膜中的纤连蛋白不是由原生殖细胞自己合成的,而是由背肠系膜细胞的内质网合成的^[5]。纤连蛋白的分泌正是由 TGF-U 来调节的,这样 TGF-U 就间接地控制了原生殖细胞的迁移速度^[6]。遗传分析表明,妨碍生殖细胞发育的因子与 W 位点有关,该基因位点不同于正常的 WW 表现型,因后者干预血细胞生成和生殖细胞的发育。最新研究表明, W 编码原癌基因 *c-kit* 受体酪氨酸激酶^[7],该激酶位于生殖细胞内,可能参与了生殖细胞发育的某一调节过程。

1.2 卵原细胞的增殖

一般情况下在动物出生前其生殖细胞完成有丝分裂,观察表明,增殖期的长短随品种的不同而异,牛在其怀孕 7.5 个月还能观察到这种生殖细胞的增殖现象^[11],而猪一直持续到出生后的 35 d。小鼠近出生时,所有卵原细胞停止有丝分裂,进入减数分裂前期,转变为卵母细胞。兔在出生后 10 d 有丝分裂结束。显然,有丝分裂产生大量的卵原细胞,如牛大约 200 万,但到出生时,绝大部分 (90%~99%) 退化,仅有很少的卵母细胞 (约不足 1%) 达到排卵前阶段。牛的原始卵泡的周围大致有一层 14~29 个扁平的体细胞 (或颗粒细胞)。

原始卵泡的形成时期,因动物品种不同而异。在某些动物品种 (如猪和反刍动物) 大部分甚或所有的原始卵泡是在胎儿时期形成的,而另一些品种,如啮齿动物和兔则在生后早期出现^[10]。动物出生后期组成原始库的卵泡数量也因动物不同而异,小鼠约数千个,而家畜和人类有数十万个^[10]。原始卵泡的直径在各种动物的变化范围不是很大,牛为 30~50 μm ,其卵母细胞为 20~35 μm ^[13,14]。其他动物如猪和人及小实验动物的原始卵泡直径和其卵母细胞的直径基本上与牛一致^[15,16]。在正在发育的小腔前卵泡数和每个周期的长度以及排出的卵的数量之间有明显的相关。绵羊每天有 2~3 个原始卵泡离开原始卵泡库开始生长,牛约 6 个。

1.3 生长卵泡的发育

卵泡生长的同时,其卵母细胞也在生长,二者直径的增加具有相关性。牛的初级卵泡的直径为 40~60 μm ,而其卵母细胞的直径为 30~40 μm ^[13,14],周围的颗粒细胞数从 25 到 58 个不等,除了其数量增加以外,体积也不断增加。研究表明,从原始卵泡到初级卵泡的过渡阶段,卵泡的颗粒细胞变长并呈波形纤维蛋白 (vimentin) 阳性^[8]。这种波形纤维蛋白 (或称微支肽) 组织成束与增加的磷酸化有关,而且出现在有丝分裂之前的细胞内。从原始卵泡向初级卵泡过渡以及随后的卵泡生长,可在动物繁殖周期的任何阶段发生。

次级卵泡的颗粒细胞层数随动物的不同而异。牛可达到 6 层,猪可达到 10 层,而其最大直径牛为 150 μm ^[17],猪可达到 300 μm ^[18]。小实验动物和人的卵泡的大小居于牛和猪之间,其最大直径约为 200 μm 。从初级卵泡阶段到有腔阶段的发育,猪需要 84 d,达到排卵阶段尚需要 21 d^[18]。牛的腔前卵泡的生长率比其有腔时 ($\geq 0.5 \text{ mm}$) 要慢得多^[17]。人的原始卵泡到明显有腔阶段需 70 d^[12],大鼠和小鼠的初级卵泡到排卵前阶段需要 14~16

d, 当卵泡发育到一定阶段, 开始分泌卵泡液, 特别是在发情周期的卵泡期, 由于卵泡液的积累, 有腔卵泡在 2 d 内可达到 $10 \text{ mm}^{[19]}$, 在排卵前小鼠的大型正常卵泡含有 0.3×10^6 个颗粒细胞, 绵羊为 3.5×10^6 个, 人类含有 50×10^6 个, 因动物的不同而有较大差别。

在卵泡生长的同时, 卵母细胞也在生长, 但各种动物的卵母细胞的大小不同。当达到次级卵泡时, 牛的卵母细胞直径为 $60 \mu\text{m}$, 猪为 $90 \mu\text{m}^{[16]}$, 小鼠为 $70 \mu\text{m}$, 而人为 $80 \mu\text{m}$ 。一般在腔出现前夕卵母细胞生长减慢并开始获得减数分裂恢复的能力, 而在有腔阶段卵母细胞的直径继续增加, 达到 $150 \mu\text{m}$ (牛、绵羊和山羊), 猪为 $130 \mu\text{m}$, 人类为 $125 \mu\text{m}$ 。牛原始卵泡到充分生长的卵泡阶段超微结构表明, 卵母细胞内的细胞器的数量逐渐增加, 而且与核的分化相一致, 皮质颗粒的形成和间隙连接的发育都是首次在次级卵泡阶段发生。

2 卵泡的体外发育

2.1 腔前卵泡的分离和培养

分离腔前卵泡的最终目的是用于培养, 既要求足够多的数量, 更要求完好的质量。作为分离腔前卵泡的方法学也是腔前卵泡体外发育的重要研究内容之一。最早分离卵巢卵泡始于 60 年代, 其主要手段是酶法分离。在 70 年代, 比较成功地建立起一套家兔卵巢卵泡的分离方法。以后关于该领域的分法学研究更加深入细致。Eppig 等曾用胶原蛋白酶分离小鼠腔前卵泡, 获得了大量的小腔前卵泡^[20], 但实际上是颗粒细胞——卵母细胞复合体。Figueiredo 等用酶结合机械法分离牛腔前卵泡取得比较好的效果^[13], 分离出的卵泡绝大部分是初级卵泡。目前这种方法使用的比较广泛。也有采用纯机械法分离, 目的是为了减少酶对卵泡的损害。许多研究者利用显微剖解法分离大腔前卵泡。但随着分离技术的改进, 酶法分离可获得大量的结构完整的腔前卵泡, 包括牛、人、猪和兔及啮齿动物。

与一般的体细胞培养和达到有腔阶段的卵泡卵母细胞的培养比较, 腔前卵泡的培养难度较大。目前啮齿类动物的腔前卵泡的培养体系基本建立起来, 真正取得突破性进展是在 80 年代末, Eppig 等体外培养小鼠腔前卵泡卵母细胞成熟, 经体外受精和移植产生了活的后代^[21], 这就标志着开发和利用哺乳动物腔前卵泡卵母细胞资源的可能性。在家畜腔前卵泡的体外培养研究方面, 日本学者 Hirao 等^[22]培养猪大腔前卵泡卵母细胞达到成熟, 产生了第一极体, 虽然产生极体的比率不高, 但在家畜方面的研究取得了长足的进展。牛小腔前卵泡 ($30\text{--}70 \mu\text{m}$) 的体外培养可存活 7 d, 颗粒细胞增殖分化, 直径增加幅度最大为 $20 \mu\text{m}^{[23]}$, 而其大腔前卵泡 ($170 \mu\text{m}$) 5 d 内直径增加 $55 \mu\text{m}$ 。培养体系对哺乳动物腔前卵泡的成活和生长发育有很大影响。在腔前卵泡的培养方法上概括起来有二维培养和三维培养两种体系。在猪和牛的腔前卵泡的体外培养中, 均采用了胶原蛋白包埋法, 使卵泡的生长尽可能地接近体内, 形成一种立体结构。啮齿类动物的腔前卵泡培养于胶原蛋白浸润膜上或培养于微滴内均能生长发育, 但采用后一种方法时, 正常的卵泡的组织结构不能保持。多聚赖氨酸铺层培养大鼠腔前卵泡, 不仅能使卵泡存活、生长和发育, 而且在体外观察到了卵泡的内膜的形成过程和卵泡腔的形成^[9]。虽然对家畜腔前卵泡的培养体系已作了很多探索, 但仍然没有一套切实可行的方法, 还需要作进一步的努力。

2.2 促性腺激素和生长因子对腔前卵泡体外发育的影响

研究表明, 卵泡在体内的发育和促性腺激素特别是 FSH 有着密切的关系^[11], 虽然原

始卵泡的启动机理尚不清楚,但认为与 FSH 有关。已经证明,FSH 的结合位点和受体存在于牛和人的初级卵泡和次级卵泡及有腔卵泡的颗粒细胞上^[24,25]。没有 FSH 的存在,人的卵泡在体外不能形成腔。小鼠的小腔前卵泡的生长和发育似乎对 FSH 的需求不严格,但 FSH 的基础水平对小卵泡的发育是必要的。LH 也能起到 FSH 的作用。雌二醇和 FSH 协同作用能提高大鼠和猪^[25]的大腔前卵泡颗粒细胞的增殖和腔的形成,雌二醇虽然对颗粒细胞的增殖活动不产生影响,但能提高牛的初级卵泡和小次级卵泡的体积^[26]。至少雌二醇与其他激素有协同作用。在体内充足的新血管的形成能提供足够的激素以促进小腔前卵泡的发育,这对激活原始卵泡可能是必不可少的。

影响腔前卵泡发育的因子很多,如 EGF, IGF, TGF, VEGF, VIP, Activin, bFGF, inhibin 和 NGFs 等。这些因子对卵泡内的旁分泌交流施加影响。Activin 和 inhibin 以自分泌或旁分泌形式来调节卵泡的发育。Activin 对体外培养的牛初级卵泡和小次级卵泡有促进生长的作用^[26]。已经证明在其卵母细胞和颗粒细胞上存在 Activin 的受体^[26]。

在卵泡中,IGFs 主要由颗粒细胞和泡膜细胞所产生,具有促进颗粒细胞增殖的功能,增强细胞的存活率,刺激 DNA 的合成。IGF-I 还能促进基膜蛋白多糖的产生。EGF 能刺激颗粒细胞 FSH 受体和 FSH 诱导的孕酮的产生。并已证明 EGF 参与猪^[18]、仓鼠^[27]和牛^[25]的初级卵泡和次级卵泡的颗粒细胞的增殖。bFGF 刺激牛腔前卵泡的生长^[25],这种刺激作用很可能通过颗粒细胞间的扩增来进行。它还能刺激猫腔前卵泡颗粒细胞的增殖,这种作用不受 EGF 的调节。TGF 有两种即 TGF- β 和 TGF- α ,在仓鼠的研究表明,前者刺激 FSH 诱导的颗粒细胞的 DNA 合成,而后者的作用则相反^[27]。但是 TGF- β 对牛腔前卵泡的存活率有负面影响^[25]。最近发现牛初级卵泡的形成伴随有 VIP 和 NPY 的超量产生^[28],VIP 能刺激分离的牛初级卵泡和早期次级卵泡的体外发育。研究表明,生长因子的作用机制是很复杂的,而且在多种生长因子之间存在着相互作用^[29],并参与了内分泌的调节过程,和促性腺激素及类固醇激素共同调节卵泡的生长和发育,这方面的机制尚不很清楚。

目前在哺乳动物腔前卵泡的研究中需要增加的研究内容是如何鉴定腔前卵泡的质量,包括卵母细胞的质量标准,这样才能更准确地评价其培养体系的优劣。目前多采用共聚焦激光扫描显微镜,采用这种手段已鉴定出在光镜下分离正常的卵母细胞和颗粒细胞中,含有已经死亡的颗粒细胞和退化的卵母细胞,关于这方面的工作需要有关学者作出不懈的努力。

3 研究展望

到目前为止,已获得从腔前卵泡(包括初级和次级卵泡)卵母细胞体外培养的小鼠后代。猪腔前卵泡的体外培养也获得成熟,并能使精子穿入。各种哺乳动物的腔前卵泡的培养特别是大腔前卵泡的培养得到一定程度的生长。小腔前卵泡在体外的存活时间延长。在体外啮齿类动物和人的初级卵泡可以发育到次级卵泡阶段,次级卵泡可以发育到有腔阶段,表明哺乳动物腔前泡卵母细胞可以实现体外发育和体外成熟。随着腔前卵泡分离技术的不断改进,最适培养体系的建立,以及腔前卵泡发育的内在机制的深入探索,该领域的研究必将取得突破,这对于揭示卵子发生和卵泡发育的内在规律具有重要的理论意义,为

动物生产的实际应用奠定良好的理论基础和技术路线

参 考 文 献

- 1 Fazel A R, Schulte B A, Spicer S S. Glycoconjugate unique to migrating germ cells differs with genera. *Anat Rec*, 1990, 228 177~ 184
- 2 Ginsburg M, Snow M H L, McLaren A. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development*, 1990, 110 521~ 528
- 3 Godin I. Genital ridges exert long-range effects on mouse primordial germ cell numbers and direction of migration in culture. *Development*, 1990, 108 357
- 4 Godin I, Wylie C C. TGF- β_1 inhibits proliferation and has behave differently in culture. *Cell*, 1986, 44 831~ 838
- 5 Frech-Constant C. Response to fibronectin of mouse primordial germ cells before, during and after migration. *Development*, 1991, 113 1365
- 6 Godin I, Wylie C C. TGF- β_1 inhibits proliferation and has a chemotropic effect on mouse primordial germ cells in culture. *Development*, 1991, 113 1451~ 1457
- 7 Motro B, Van Der Kooy D, Rossant J, et al. Contiguous patterns of c-kit and steel expression: analysis of mutations at the W and S β Loci. *Development*, 1991, 113 1207~ 1221
- 8 Van der Hurk R, Dijkstra G, Van Mil F N. Distribution of the intermediate filament proteins vimentin, keratin and desmin in the bovine ovary. *Mol Reprod Develop*, 1995, 41 459~ 467
- 9 Lisa Cain, Shilla chetterjee, thomas J, et al. In Vitro folliculogenesis of rat preantral follicles. *Endocrinology*, 1995, 136 3369
- 10 Hershfield A N. Development of follicles in the mammalia ovary. *Int Rev Cytol*, 1991, 124 43~ 101
- 11 Adshi E Y. Independ and synergistic actions of somatomedin- c in the stimulation of proteoglycan biosynthesis by cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 1986, 118 456~ 459
- 12 Lunenfeld B, Insler V. Follicular development and its control. *Gynecol Endocrinol*, 1993, 7 283~ 291
- 13 Figueiredo J R, Hulshof S C J, Van der Hurk R, et al. Development of a new mechanical method for the isolation of intact preantral follicles from fetal calf and adult bovine ovaries. *Theriogenology*, 1993, 40 789~ 799
- 14 Hulshof S C J, Bevers M M, Van der Donk H A, et al. Isolation and Characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. *Vet Quart*, 1994, 16 78~ 80
- 15 Morbeck D E, Flowers W L, Britt J H. Response of porcine granulosa cells isolated from primary and secondary follicles of FSH, 8-bromo-cAMP and EGF in Vitro. *J Reprod Fertil*, 1993, 99 577~ 584
- 16 Telfer E E. The development of methods for the isolation and culture of preantral follicles from bovine and porcine ovaries. *Theriogenology*, 1996, 45 101~ 110
- 17 Lussier J P, Matton P, Dufour J J. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *J Reprod Fertil*, 1987, 81 301 ~ 307
- 18 Morbeck D E, Esbenshade K L, Flowers W L, et al. Kinetics of follicle growth in the prepubertal gilt. *Biol Reprod*, 1992, 47 485~ 491
- 19 Van den Hurk R, Dijkstra G, Hulshof S C J, et al. Micromorphology of antral follicles in cattle after prostaglandin induced luteolysis with particular reference to atypical granulosa cells. *J Reprod Fertil*, 1994, 100 137 ~ 142

- 20 Eppig J J, O'Brien M J. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol Reprod*, 1996, 54: 269~ 276
- 21 Eppig J J, Schroeder A C. Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation and fertilization in vitro. *Biol Reprod*, 1989, 41: 269~ 276
- 22 Hrao Y, Nagai T, Kubo M, et al. In vitro growth and maturation of pig oocytes. *J Reprod Fertil*, 1994, 100: 333~ 339
- 23 Hulshof S C J, Figueiredo J R, Becker J F, et al. Effect of recombinant human FSH, 17β -oestradiol and their combination on bovine preantral follicles in vitro. *Theriogenology*, 1995, 44: 217~ 226
- 24 Zheng W, Magid M S, Kramer E E, et al. FSH receptor is expressed in human ovarian surface epithelium and fallopian tube. *Am J Pathol*, 1996, 148: 47~ 53
- 25 Wandji S A, Eppig J J, Fortune J E. FSH and growth factors affect the growth and endocrine function in vitro of granulosa cells of bovine preantral follicles. *Theriogenology*, 1996, 45: 817~ 832
- 26 Hulshof S C J. Bovine preantral follicles and their development in vitro (Thesis). Netherland University of Utrecht, 1995
- 27 Roy S K. TGF- β potentiation of FSH-induced DNA synthesis in hamster preantral follicles is mediated by a latent induction of EGF. *Biol Reprod*, 1993, 48: 558~ 563
- 28 Hulshof S C J, Dijkstra G, Van der Beek E M, et al. Immunocytochemical localization of vasoactive intestinal peptide and Neuropeptide Y in the bovine ovary. *Biol Reprod*, 1994, 50: 553~ 560
- 29 Roy S K. TGF- β potentiation of FSH-induced DNA synthesis in hamster preantral follicles is mediated by a latent induction of EGF. *Biol Reprod*, 1993, 48: 558~ 563

In Vivo and In Vitro Development of Preantral Follicles in Mammals

Zhou Huanmin Zhang Yong

(The Unit of Developmental Biology, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract The in vivo and in vitro developmental patterns of mammalian ovarian preantral follicles were basically similar, but different animals had their own features. The preantral follicles were able to develop and mature in vitro under a suitable condition. The gonadotropins and growth factors had regulating functions in the in vitro development of follicles. The identification of the quality of developing follicles and the establishments of the criterion of oocytes and the culture systems of follicles still remain to be solved.

Key words mammals, preantral follicles, in vivo development, in vitro development