

山羊卵泡卵母细胞体外成熟的研究

张涌 刘泽隆 李裕强

(西北农业大学动物科学与动物医学学院, 陕西杨凌 712100)

摘 要 研究了 FCS, 1β - E_2 , FSH, LH 对山羊卵泡卵母细胞成熟的作用, 及培养时间对卵母细胞核和细胞质成熟的影响。结果表明, 添加体积分数为 10%~15% 的 FCS, $1\sim 2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 1β - E_2 , $20\sim 50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ LH 和 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ FSH 有利于提高卵母细胞核成熟, 并放出第一极体。而成熟培养 20~24 h 的卵母细胞成熟率显著高于培养 16 h ($P < 0.05$), 核成熟后培养 3~4 h 有利于卵母细胞质成熟, 对其后的受精、卵裂及胚胎的进一步发育有重大影响。且 TCM 199+ 质量分数为 10%~15% 的 FCS+ $1\sim 2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 1β - E_2 + $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ FSH + $20\sim 50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ LH 是卵母细胞成熟的理想培养系统。

关键词 山羊, 体外成熟, 卵母细胞

分类号 S827.36 Q492.5

随着体外受精技术的发展, 山羊卵母细胞体外成熟显得愈来愈重要。许多证据表明^[1~3], 体外受精囊胚期前细胞的代谢活动主要是由母源性基因及其产物, 如 mRNA、rRNA、蛋白质等调控的。因此, 卵母细胞成熟情况是决定受精率及囊胚发育率高低的关键。影响卵母细胞成熟的因素很多, 主要包括卵泡大小、卵巢的发育阶段、培养基、激素及生长因子等。据报道^[4,5], 牛卵母细胞体外成熟时间为培养后 18~24 h, 受精率、受精胚发育率也有差异。对金黄仓鼠和大鼠, 研究认为^[6,7], FSH 对核成熟有抑制作用, 而且对减数分裂纺锤体有损害; hCG 和 LH, 尤其是 hCG 使极体排出率和自发激活增加, 从而增加卵母细胞异常成熟率^[8]。促性腺激素对卵母细胞的有害作用可被添加血清抵消。本研究的目的在于探讨 FCS, FSH, LH, 1β - E_2 及培养时间对卵母细胞成熟的影响。

1 材料与方法

1.1 卵巢的采集

卵巢采集于西安市大型屠宰场。山羊被宰杀后, 剖腹取出卵巢, 放于 25~37℃ 加有青链霉素的生理盐水中, 在 8~10 h 内送至实验室进行实验。

1.2 卵母细胞的采集

在无菌条件下, 将卵巢用灭菌生理盐水洗涤 3~5 次, 盛于大烧杯中, 用带有 12 号针头的 5~10 mL 注射器抽吸表面卵泡卵母细胞。卵泡大小为 2~6 mm。将收集的液体于 6~10 cm 的培养皿中放置 10 min, 去除上清液, 加入 PBS 清洗 3 次, 以便检卵。根据包被卵母细胞的卵丘细胞完整性, 以及卵母细胞的胞质均匀性将卵母细胞分为 3 级: A 级, 卵丘

收稿日期 1998-02-02

课题来源 农业部生物技术重点项目, 95 牧-01-04-01

作者简介 张涌, 男, 1956 年生, 教授, 博士生导师

细胞完整, 卵母细胞胞质均匀; B 级, 卵丘细胞不完整, 卵母细胞胞质均匀; C 级, 卵母细胞裸露, 或胞质略有退化。选择 A, B 级进行培养。

1 3 卵母细胞的体外培养

将 A, B 级卵丘卵母细胞复气体放于 50 μ L 的微滴中培养, 每滴中约 10~ 20 个, 培养环境温度为 39 $^{\circ}$ C、体积分数为 5% 的 CO₂ 空气和饱和湿度。对照组培养基为 TCM 199+ 10 mg $\cdot$ L⁻¹ LH+ 10 mg $\cdot$ L⁻¹ FSH+ 1 mg $\cdot$ L⁻¹ 1 β -E₂+ 体积分数为 10% 的 FCS (所用 TCM 199 购自 Gibco 公司, 1 β -E₂ 购自 SERVA 公司, FSH, LH 购自宁波市第二激素厂, FCS 购自西北农业大学兽药厂)。

1 4 试验设计

为检查 FCS 质量浓度及培养时间对卵母细胞成熟的影响, 分别按 FCS 体积分数为 0%, 10%, 15%, 20%, 培养时间为 16 20 24 h 设计一个二因素多水平试验。为检查不同质量浓度 1 β -E₂ 对卵母细胞成熟率的影响, 分别按 1 β -E₂ 的质量浓度 0 1 2 5 10 mg $\cdot$ L⁻¹ 培养卵母细胞。以下培养时间皆为 24 h 为检查同时改变 FSH, LH 质量浓度对卵母细胞成熟的影响, 根据 FSH 和 LH 质量浓度 (mg $\cdot$ L⁻¹) 设计 5 个组, 即 0 0 10 10 20 20 50 50 100 100 为了解 FSH 质量浓度为 10 mg $\cdot$ L⁻¹ 时, LH 质量浓度的改变对卵母细胞成熟的影响, 按不同 LH 质量浓度 (0 10 20 50 100 mg $\cdot$ L⁻¹) 设计一个单因素多水平试验。为了解 LH 质量浓度为 10 mg $\cdot$ L⁻¹ 时, FSH 浓度的改变对卵母细胞成熟的影响, 按 FSH 质量浓度分别为 0 10 20 50 100 mg $\cdot$ L⁻¹ 设计了一个单因素多水平试验。

2 结果与分析

2 1 FCS 及培养时间对卵母细胞成熟的影响

从表 1 可以看出, 培养基中不添加 FCS 与添加体积分数为 10%, 15% 和 20% 的 FCS 时, 各组间成熟率差异极显著。同时也可以看出, 培养 16 h 时卵母细胞的成熟率与培养 20 和 24 h 时的差异显著, 而培养 20 与 24 h 时的成熟率差异不显著。

表 1 不同体积分数的 FCS 及培养时间对卵母细胞成熟率的影响								%
FCS 体积 分数 /%	培养 卵子数 /个	16		20		24		
		成熟 卵子数 /个	成熟率 /%	成熟 卵子数 /个	成熟率 /%	成熟 卵子数 /个	成熟率 /%	
0	40	0	0 a	0	0 a	0	0 a	
10	80	54	67.5 b	66	82.5 c	66	82.5 c	
15	80	54	67.5 b	67	83.8 c	67	83.8 c	
20	80	55	68.5 c	67	83.8 c	67	83.8 c	

注: ① a⁺ b⁺ a⁺ c⁺ P<0.01 b⁺ c⁺ P<0.05
② 括号内数字为成熟率。

2 2 1 β -E₂ 对卵母细胞成熟的影响

从表 2 中可以看出, 不添加 1 β -E₂ 与添加 1 β -E₂ 组的各组间差异极显著。添加 10 mg $\cdot$ L⁻¹ 1 β -E₂ 组则明显低于添加 1, 2 5 mg $\cdot$ L⁻¹ 组, 差异极显著。

表 2 1β-E₂对卵母细胞成熟的影响

1β-E ₂ 质量浓度 /(mg° L ⁻¹)	培养卵子数 /个	成熟卵子数 /个	成熟率 %
0	40	0	0 a
1	80	66	82.5 b
2	80	68	85.0 b
5	80	62	77.5 b
10	80	14	17.5 c

注: a⁺ b⁺ c; P<0.01

2.3 FSH 和 LH 对卵母细胞成熟的影响

同时改变 FSH, LH 的质量浓度研究其对卵母细胞成熟的影响, 结果 (表 3)发现, 未添加 FH, LH 组与添加组差异极显著, 添加 FSH, LH 各组之间差异不显著。

表 3 LH, FSH 对卵母细胞成熟的影响

FSH 质量浓度 /(mg° L ⁻¹)	LH 质量浓度 /(mg° L ⁻¹)	培养卵子数 /个	成熟卵子数 /个	成熟率 %
0	0	40	0	0 a
10	10	40	33	82.5 b
20	20	40	35	87.5 b
50	50	40	31	77.5 b
100	100	40	31	77.5 b

注: a⁺ b; P<0.01

2.4 LH 对卵母细胞成熟的影响

从表 4可以看出, 不添加与添加 LH 各组间卵母细胞成熟率差异极显著, 添加 10 mg° L⁻¹组与添加 20, 50, 100 mg° L⁻¹组间差异显著。

表 4 LH 对卵母细胞成熟的影响

LH 质量浓度 /(mg° L ⁻¹)	培养卵子数 /个	成熟卵子数 /个	成熟率 %
0	40	0	0 a
10	80	66	82.5 b
20	160	148	92.5 c
50	160	148	92.5 c
100	80	70	87.5 d

注: a⁺ b; a⁺ c; a⁺ d; P<0.01; b⁺ c; P<0.05

2.5 FSH 对卵母细胞成熟的影响

不同质量浓度的 FSH 对卵母细胞成熟的影响测定结果见表 5

表 5 FSH 对卵母细胞成熟的影响

FSH 质量浓度 /(mg° L ⁻¹)	培养卵子数 /个	成熟卵子数 /个	成熟率 %
0	40	12	30 a
10	80	66	82.5 b
20	80	67	82.5 b
50	80	55	68.8 c
100	80	54	67.5 c

注: a⁺ b; a⁺ c; P<0.01; b⁺ c; P<0.05

从表 5 可以看出, 在 LH 质量浓度维持 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 不变的情况下, 不添加 FSH 组与添加组间成熟率差异极显著; 添加 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ FSH 组与添加 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ FSH 组间成熟率差异显著。

3 讨 论

本研究发现, 在添加 FCS 体积分数为 $10\% \sim 15\%$ 时, 添加一定比例的激素 ($1 \sim 2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 1\beta\text{-E}_2$; $20 \sim 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LH; $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ FSH) 有利于卵母细胞核成熟, 极体排出率高且形态正常; 核成熟后再培养 $3 \sim 4 \text{ h}$, 有利于胞质成熟。

胎牛血清中含有卵母细胞成熟所需要的激素和生长因子^[9], 如胰岛素, 它有利于卵丘细胞或卵母细胞的生长发育。卵丘细胞可将一些物质输送到卵母细胞^[10], 促使卵母细胞的胞核和胞质成熟。本研究发现, 适当的 FCS 有促进卵母细胞核成熟的作用。

刚排出的卵 (M II 期) 不具有受精能力, 需在输卵管内充分成熟。钱菊汾等^[11]称之为卵子获能。卵子获能时, 卵黄皮质颗粒增加且向卵黄膜移动, 数量达到高峰时, 卵子的受精率也最高。卵子获能可能还与细胞器分布、 Ca^{2+} 释放系统成熟、蛋白质合成和磷酸化等有关。本研究发现, 卵母细胞核成熟后再培养 $3 \sim 4 \text{ h}$ 确实有利于提高卵母细胞的成熟——对受精卵裂和胚胎发育有重大影响。

卵泡腔开始形成时, 雌二醇可增强 FSH 刺激颗粒细胞有丝分裂和卵泡液的形成, 雌激素可促进蛋白质的合成, 因此一定浓度的雌二醇可促进颗粒细胞蛋白质的合成, 并进而影响卵母细胞的成熟。用雌二醇处理公牛间质细胞时, 雌二醇可进入细胞质和细胞核并调节其功能; 用苯甲酸雌二醇处理间质细胞, 其合成睾酮的能力降低, 可能是雌激素使细胞色素 P450 水平降低。高质量浓度的 $1\beta\text{-E}_2$ 可能抑制颗粒细胞内芳香化酶活性, 并进而抑制雌二醇生成途径的多种酶活性, 颗粒细胞不能正常行使合成功能, 导致卵母细胞成熟受抑制, 这可能是高浓度 ($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 雌二醇抑制卵母细胞核成熟的原因。在体内, 高浓度雌激素可导致卵泡囊肿, 正常情况短暂的雌激素峰下降后才出现 LH 峰^[12, 13]。在绵羊^[14], E_2 能抑制完整卵泡类固醇的合成, 降低卵母细胞成熟后的受精能力和发育能力。

在体内, FSH 能促进优势卵泡的颗粒细胞增殖, 并增加细胞上的 LH 受体; 在 LH 峰的作用下, 卵母细胞减数分裂恢复并导致排卵。在体外, FSH 和 LH 起着十分重要的作用^[15]; 但有人认为^[6, 7], 促性激素抑制卵母细胞成熟, FSH 不仅抑制胞质和胞核成熟, 而且对减数分裂纺锤体有损害; LH 和 hCG 尤其是 hCG, 使极体排出率和自发激活增加^[8]。但促性腺激素的这些副作用可在添加血清的情况下被抵消。本研究发现, 在添加血清的情况下, 不添加促性腺素不利于卵母细胞成熟, 而添加一定比例的促性腺激素, 尤其是 $20 \sim 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LH; $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ FSH (这与排卵前 LH 峰的作用相似^[11]), 则有利于胞核成熟, 即极体排出率高且形态正常。曾有研究^[10]表明, FSH 可通过升高颗粒细胞内 cAMP 水平而使卵母细胞成熟受到抑制; FSH 还可使卵丘细胞扩散^[16] (但有人^[8]认为卵丘扩散主要是由血清引起的), 使经卵丘细胞运输到卵母细胞并抑制卵母细胞成熟的物质如 cAMP 减少, 导致卵母细胞成熟。

参 考 文 献

- 1 King W A, Chartnair I K, Opečný V, et al Nucleolus organizer regions and nucleoli in mammalian embryos. *J Reprod Fertil* 1989 38(Suppl): 63~ 71
- 2 Plante L, Plante C, Shepherd P L, et al Cleavage and ^3H -Uridine incorporation in bovine embryos of high in vitro developmental potential. *Molec Reprod Dev*, 1994 39 375~ 383
- 3 Lonergan P. Growth of preimplantation bovine embryos. *Acta vet scand* 1994 35 307~ 320
- 4 刘建民, 刘 健, 朱裕鼎. 牛卵母细胞及其受精能力的研究. *兽医大学学报*, 1989 9(4): 356~ 362
- 5 Prokofier M I, Emst L K, Surava N M, et al Bovine oocytes maturation, fertilization and further development in vitro and after transfer into recipients. *Theriogenology*, 1992 38 461~ 469
- 6 Lawrence T S, Deke N, Beer W H. Binding of human chorionic gonadotropin by rat cumulus oophori and granulosa cells: a comparative study. *Endocrinology*, 1980 106 1114~ 1118
- 7 Rose T A, Bavister B D. Fertilization of in vitro matured oocytes from golden hamster. *J Exp Zool* 1983 226 481~ 485
- 8 Plancha C E, Albertini D F. Hormonal regulation of oocyte maturation in the hamster oocyte involves a cytokine-mediated process. *Biol Reprod*, 1994 51 852~ 864
- 9 卢晟盛, 卢克焕. 不同血清种类及其浓度对牛卵母细胞体外受精的影响. *广西农业大学学报*, 1994 13(1): 21~ 26
- 10 李朝军, 范必勤, 王全义, 等. FSH、EGF、胰岛素促进卵母细胞体外减数分裂恢复机制的研究. *细胞生物学杂志*, 1997 19(1): 27~ 30
- 11 王建辰主编. 家畜生殖内分泌学. 北京: 农业出版社, 1993
- 12 Stagniller R B. Folliculogenesis in the bovine. *Theriogenology*, 1982 17(1): 43~ 52
- 13 Ginther O J, Kotik W, Iltham M C, et al Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. *Theriogenology*, 1995 43 489~ 703
- 14 Saeki K, Hoshi M, Leibfried-Rutledge M L, et al In vitro fertilization and development of bovine oocytes matured in serum-free medium. *Biol Reprod*, 1991, 44 256~ 260
- 15 Armstrong D T, Irvine B J, Earl C R, et al Gonadotropin stimulation regimens for follicular aspiration and in vitro embryo production from calf oocytes. *Theriogenology*, 1994 42 1227~ 1236
- 16 Leibfried-Rutledge M L, Cister E S, Eyestone W H, et al Development potential of bovine oocytes matured in vitro or vivo. *Biol Reprod* 1987 36 376~ 382

Studies on Goat Oocytes in vitro Maturation

Zhang Yong Liu Zelong Li Yuqiang

(College of Animal Science and Veterinary Medicine Northwestern
Agricultural University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract The effects of FCS, culture time, 1β -estradiol, FSH and LH on goat oocytes in vitro maturation were studied. The results suggested that an addition of 10% - 15% FCS, $1\sim 2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 1β -E₂, $20\sim 50\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ LH and $10\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ FSH was effective to improve oocyte nuclear maturation, and to extrude the first polar body. The maturation rate of oocytes cultured for 20~24 h was significantly higher than that of 16 h ($P < 0.05$). After nuclear maturation, culture for 3~4 h was beneficial to oocyte cytoplasm maturation, and had a significant effect on fertilization, cleavage and embryo development. An addition of 10% - 15% FCS, $10\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ FSH, $10\sim 50\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ LH and $1\sim 2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 1β -E₂ in the TCM 199 medium was an ideal culture system for goat oocyte in vitro maturation.

Key words goat in vitro maturation oocyte