

# 牛卵泡卵母细胞体外成熟的研究

刘泽隆 张 涌

(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,  $1\beta$ - $E_2$ , FSH, LH 对牛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,  $1\sim 2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$   $1\beta$ - $E_2$ ,  $20\sim 50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  LH 和  $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  FSH 有利于提高卵母细胞核成熟, 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 TCM199+ 质量分数 10%~15% 的 FCS+  $1\sim 2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$   $1\beta$ - $E_2$ +  $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  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** 牛, 体外成熟, 卵母细胞

**分类号** W823.36, Q492.5

随着体外受精技术的发展, 牛卵母细胞的体外成熟显得愈来愈重要。许多证据表明, 体外受精囊胚期前的胚胎代谢活动主要是由母源性基因及其产物, 如 mRNA, rRNA, 蛋白质等所调控的<sup>[1-3]</sup>, 因此卵母细胞成熟情况是决定受精率及其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、激素以及生长因子等。据报道, 牛卵母细胞体外成熟时间为培养后 18~24 h, 但受精率、受精胚发育率也有差异<sup>[4,5]</sup>。在金黄仓鼠和大鼠, 曾有人研究认为 FSH 对核成熟有抑制作用, 而且对减数分裂纺锤体有损害<sup>[6,7]</sup>; 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<sup>[8]</sup>。促性腺激素对卵母细胞的有害作用可被添加血清所抵消。张涌和刘泽隆等研究了不同浓度的血清, FSH, LH,  $E_2$  及培养时间对卵母细胞成熟的影响<sup>[9]</sup>, 并认为 TCM199+ 质量分数 10%~15% 的 FCS+  $1\sim 2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$   $1\beta$ - $E_2$ +  $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  FSH+  $20\sim 50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  LH 是山羊卵泡卵母细胞成熟的理想培养系统。本研究的目的在于验证该系统是否是牛卵泡卵母细胞成熟的理想培养系统。

## 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。牛被宰杀后, 剖腹取出卵巢, 放于  $25\sim 37^\circ\text{C}$  的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 方 法

牛卵泡卵母细胞的采集和培养方法参见张涌和刘泽隆等的方法<sup>[9]</sup>。

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 刘泽隆, 男, 1971 年生, 在读博士生

### 1.3 试验设计

参考文献 [9]的设计方法

## 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 各组间成熟率差异极显著 ( $P < 0.01$ ). 同时也可以看出,培养 16 h 的卵母细胞的成熟率与培养 20, 24 h 时的成熟率差异显著 ( $P < 0.05$ ),而培养 20 与 24 h 的卵母细胞成熟率差异不显著 ( $P > 0.05$ ). 培养 24 h 检查极体形态, FCS 体积分数为 10% ,15% ,20% 各组的正常率分别为 95% (19/20), 90% (18/20)和 95% (19/20),各组间无显著性差异。

表 1 不同浓度的 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	培养时间 /h					
		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	82	0 a	0	0 a	0	0 a	0
10	98	67 b	68.4	82 c	83.7	82 c	83.7
15	87	60 b	69.0	73 c	83.9	73 c	83.9
20	80	53 b	66.2	67 c	83.8	67 c	83.8

注: a<sup>1</sup> b, a<sup>2</sup> c,  $P < 0.01$ ; b<sup>1</sup> c,  $P < 0.05$ .

### 2.2 $1\beta$ -E<sub>2</sub>对卵母细胞成熟的影响

从表 2中可以看出,不添加  $1\beta$ -E<sub>2</sub> 组与添加  $1\beta$ -E<sub>2</sub> 的各组间卵母细胞成熟率差异极显著 ( $P < 0.01$ ). 添加  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$   $1\beta$ -E<sub>2</sub> 组卵母细胞成熟率则明显低于  $1, 2, 5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组,差异极显著 ( $P < 0.01$ ). 培养 24 h 检查极体,添加  $1, 2, 5, 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$   $1\beta$ -E<sub>2</sub> 各组间极体形态正常率分别为 95% (19/20), 95% (19/20), 90% (18/20)和 88.9% (16/18),各组间无显著性差异。

表 2  $1\beta$ -E<sub>2</sub>对卵母细胞成熟的影响

$1\beta$ -E <sub>2</sub> 质量浓度 /( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	培养卵子数 /个	成熟卵子数 /个	成熟率 %
0	100	0	0 a
1	100	82	82 b
2	85	68	80 b
5	89	72	80.9 b
10	94	18	19.1 c

注: a<sup>1</sup> b<sup>1</sup> c,  $P < 0.01$ .

### 2.3 FSH和 LH对卵母细胞成熟的影响

通过同时改变 FSH, LH 质量浓度对卵母细胞成熟的研究发现(表 3),未添加 FSH, LH 组与添加组差异极显著 ( $P < 0.01$ ),添加激素各组之间成熟差异不显著 ( $P > 0.05$ ). 培养 24 h 时检查极体,添加  $10, 20, 50, 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  FSH 和 LH 各组间极体形态正常率分别为 95% (19/20), 95% (19/20), 90% (18/20)和 85% (17/20),各组间无显著性差异。

表 3 LH 和 FSH 对卵母细胞成熟的影响

FSH 质量浓度 / ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	LH 质量浓度 / ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	培养卵子数 / 个	成熟卵子数 / 个	成熟率 / %
0	0	102	0	0 a
10	10	98	82	83.7 b
20	20	120	108	90.0 b
50	50	105	92	87.6 b
100	100	95	81	85.2 b

注: a<sup>1</sup> 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 ( $P < 0.01$ ),添加  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组与  $20, 50, 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组间差异显著 ( $P < 0.05$ ). 培养 24 h 时检查极体,添加  $10, 20, 50, 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  LH 各组间极体正常率分别为 90% (18/20), 95% (19/20), 95% (19/20) 和 90% (18/20), 各组间无显著性差异

表 4 LH 对卵母细胞成熟的影响

LH 质量浓度 / ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	培养卵子数 / 个	成熟卵子数 / 个	成熟率 / %
0	100	0	0 a
10	98	82	83.7 b
20	120	111	92.5 c
50	101	95	94.1 c
100	87	80	92.0 d

注: a<sup>1</sup> b, a<sup>2</sup> c, a<sup>3</sup> d,  $P < 0.01$ ; b<sup>2</sup> c,  $P < 0.05$ .

## 2.5 FSH 对卵母细胞成熟的影响

从表 5 可以看出,在 LH 质量浓度  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  不变的情况下,不添加 FSH 组与添加 FSH 组间成熟率差异极显著 ( $P < 0.01$ ); 添加  $10, 20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  FSH 组与添加  $50, 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  FSH 组间成熟率差异显著。培养 24 h 时检查极体,添加  $0, 10, 20, 50, 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  FSH 各組间极体正常率分别为 84% (21/25), 90% (18/20), 80% (16/20), 75% (15/20) 和 75% (15/20), 各组间无显著性差异

表 5 FSH 对卵母细胞成熟的影响

FSH 质量浓度 / ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	培养卵子数 / 个	成熟卵子数 / 个	成熟率 / %
0	100	25	25.0 a
10	98	82	83.7 b
20	84	71	84.5 b
50	88	63	71.6 c
100	91	63	69.2 c

注: a<sup>1</sup> b, a<sup>2</sup> c,  $P < 0.01$ ; b<sup>2</sup> c,  $P < 0.05$ .

## 3 讨 论

本研究发现,在添加体积分数 10% ~ 15% FCS 的情况下,添加一定比例的激素 ( $1 \sim 2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$   $17\beta\text{-E}_2$ ;  $20 \sim 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  LH;  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  FSH), 有利于牛卵母细胞核成熟,极体排出率高且形态正常;核成熟后再培养 3~4 h,有利于胞质成熟。上述结果验证了张涌和刘泽隆等的结论<sup>[9]</sup>。

本研究发现,在添加血清的情况下,不添加促性腺激素不利于卵母细胞成熟,只添加  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  LH 但不添加 FSH,有 25% 的卵母细胞成熟,这说明 LH 有使卵母细胞自发激活的可能;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<sup>[10]</sup>),则有利于胞核成熟,即极体排出率高且形态正常。或许高质量浓度 FSH( $50, 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )使卵母细胞内 cAMP 水平过高或使卵丘细胞扩散异常,使卵母细胞核成熟率降低;极体异常率有增加的趋势,这可能与成熟异常有关。要进一步研究超微结构,以检查卵母细胞成熟与极体、纺锤体形成和其他细胞器分布的关系。

### 参 考 文 献

- 1 King W A, Chartrain I, Kopecky V, et al. Nucleolus organizer regions and nucleoli in mammalian embryos. J Reprod Fertil, 1989, Suppl 38 63~ 71
- 2 Plante L, Plante C, Shepherd P L, et al. Cleavage and  $^3\text{H}$ -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,等.牛卵泡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 Prokofiev M I, Ernst L K, Suraveva 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, Dekel 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 meiotic maturation in the hamster oocyte involves a cytoskeleton-mediated process. Biol Reprod, 1994, 51 852~ 864
- 9 张 涌,刘泽隆,李裕隆.山羊卵泡卵母细胞体外成熟的研究.西北农业大学学报, 1999, 27(1): 14~ 18
- 10 王建辰主编.家畜生殖内分泌学.北京:农业出版社, 1993

## Studies on Bovine Oocytes in Vitro Maturation

Liu Zelong      Zhang Yong

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

**Abstract** The effects of FCS, culture time,  $1\beta$ -estradiol, FSH and LH on the bovine oocytes in vitro maturation were studied. The results suggested that additions of 10%~ 15% FCS,  $1 \sim 2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$   $1\beta$ -E<sub>2</sub>,  $20 \sim 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  LH and  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  FSH be 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 16h ( $P < 0.05$ ). 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. Addition of 10%~ 15% FCS,  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  FSH  $10 \sim 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  LH and  $1 \sim 2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$   $1\beta$ -E<sub>2</sub> in the TCM 199 medium were an ideal culture system for bovine oocyte in vitro maturation.

**Key words** bovine, in vitro maturation, oocyte