

HA 对牛卵母细胞体外成熟和早期胚胎体外发育影响的研究^{*}

赵红卫¹, 陈学进², 李青旺¹, 胡建宏¹,
江中良¹, 王立强¹, 韩增胜¹

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100; 2 上海第二医科大学 发育生物学实验室, 上海 250025)

[摘 要] 在 TCM-199 中添加一些确定的辅助成分, 探讨在无血清培养基中添加不同浓度 HA 对牛卵母细胞体外成熟及早期胚胎体外发育的影响。结果表明, 在卵母细胞成熟培养液(TCM-199-m)中添加 4.0 mg/mL 的 HA 时, 卵母细胞的成熟率和卵裂率与对照组(BSA)无显著差异($P > 0.05$), 分别为 85.14%, 83.57% 和 89.47%, 85.24%, 但显著高于其他各浓度组($P < 0.05$), 表明 HA 在卵母细胞无血清成熟培养中可代替 BSA。在受精卵体外培养液(TCM-199-c)中添加 HA 时, 囊胚发育率与对照组(BSA)差异不显著($P > 0.05$), 分别为 27.64% 和 26.51%, 但显著高于 TCM-199-c 组($P < 0.05$), 表明 HA 对牛胚胎体外发育具有明显的促进作用, 在无血清培养中可以代替 BSA。当在 TCM-199-c+HA 中添加少量的 BSA 时, 囊胚发育率(31.19%)显著高于其他各组($P < 0.05$), 表明 HA 欲完全代替 BSA 还有不完善之处, 有待进一步研究。

[关键词] 透明质酸; 牛卵母细胞; 体外成熟; 早期胚胎发育; 体外培养

[中图分类号] S823.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)06-0009-04

血清是近年来牛体外胚胎生产的主要添加物, 但血清中含有大量的细胞因子、激素、多肽、酶以及生物有害物等复杂成分, 因而不能确定影响牛胚胎体外发育的因素, 限制了对胚胎体外培养的进一步研究^[1]。目前, 国内外学者开始将注意力转向了成分确定的无血清培养。但是无血清培养的卵母细胞成熟率和囊胚发育率往往低于有血清培养^[2], 因而无血清培养系统需要进一步改进。目前国外有人在牛体外胚胎生产培养基中添加透明质酸(hyaluronic acid, HA)代替血清或牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA), 取得了一定的效果^[2], 但国内此类报道较少。HA 是由哺乳动物颗粒细胞、卵丘细胞和上皮细胞分泌的一种粘多糖^[3~7], 其主要功能是支持细胞粘附和迁移, 调控基因表达、蛋白质分泌、细胞增生与分化^[7~10]。本研究利用不同浓度的 HA 对牛卵母细胞进行体外成熟培养, 并对牛早期胚胎进行体外培养, 探索 HA 在无血清培养中的作用效果, 以期寻找牛胚胎体外无血清培养的较佳途径。

1 材料与方法

1.1 卵母细胞的采集

从屠宰场获得卵巢后, 在实验室用 PBS 冲洗干净, 用带 12 号针头的 5~10 mL 注射器从卵巢表面的卵泡中抽取卵泡液, 抽吸的卵泡直径为 2~8 mm, 将抽出的卵泡液置于直径 6 cm 的培养皿中, 在体视显微镜下捡出卵丘颗粒细胞层完整、细胞质均匀的卵母细胞。

1.2 卵母细胞的成熟培养

将选择的卵母细胞移至至少平衡 2 h 的 50 μ L 培养液中, 每滴放置 10~20 枚卵母细胞, 上覆盖石蜡油, 在 39 $^{\circ}$ C, 体积分数 5% CO₂ 和相对饱和湿度的二氧化碳培养箱中培养 22~24 h。成熟培养液(TCM-199-matured, TCM-199-m)是由 TCM-199, 10 μ g/L 表皮生长因子, 5 mmol/L 亚牛黄酸, 10 mg/L FSH 和 LH, 1 g/L 链霉素和 100 000 IU/L 青霉素组成, 并按照试验需要再添加不同浓度的

^{*} [收稿日期] 2003-11-27

[基金项目] 上海市科技兴农重点攻关项目——奶牛胚胎体外生产技术实用化研究 [农科攻字(2002)第 1-1-2 号]

[作者简介] 赵红卫(1976-), 男, 甘肃西和人, 在读硕士, 主要从事动物生殖生理与调控技术研究。

[通讯作者] 陈学进(1960-), 男, 上海市人, 副教授, 博士, 主要从事动物胚胎工程和干细胞研究。E-mail: chenxuej@yahoo.com.cn

HA 或 3 g/L BSA。

1.3 卵母细胞的体外受精

将解冻后的精液用改良的 Tyrode's 液离心洗涤 3 次, 用由 6 g/L BSA, 30 μ g/mL 肝素, 100 000 U/L 青霉素, 10 μ g/mL 亚牛黄酸和 0.3 μ g/mL 肾上腺素组成的受精液做成 50 μ L 受精滴, 与体外成熟培养的卵母细胞进行体外受精, 上覆石蜡油。在 39 $^{\circ}$ C, 体积分数 5% CO_2 和饱和湿度条件下进行培养, 48 h 后检查卵裂率。

1.4 颗粒细胞单层的制备

将挑选卵母细胞后的剩余液体离心, 并将其中所含有的颗粒细胞清洗 3 次, 每次 1 500 r/min 离心 5 min。将第 3 次清洗后所得的颗粒细胞用 TCM-199+10% 的胎牛血清制成悬浮液, 在培养皿中做成 50 μ L 的微滴, 上覆石蜡油培养 48 h 后待用。

1.5 受精卵的体外培养

将卵裂受精卵与颗粒细胞单层在 39 $^{\circ}$ C, 体积分数 5% CO_2 , 相对饱和湿度条件下共培养, 每隔 48 h 半量换液。培养液 (TCM-199-cultured, TCM-199-c) 由 TCM-199, 10 μ g/L 表皮生长因子, 5 mmol/L 亚牛黄酸, 0.1 mmol/L EDTA, 0.25 mmol/L 丙酮酸钠, 60 mg/L 非必需氨基酸, 50 mg/L 链霉素和 100 000 U/L 青霉素组成。统计 7~9 d 的囊胚总数, 计算囊胚发育率。

1.6 试验设计

1.6.1 HA 浓度对牛卵母细胞体外成熟的影响

将卵母细胞随机分配到 HA 浓度分别为 0, 1.5, 4.0

和 80 mg/mL 的 TCM-199-m 培养液中进行成熟培养, 以 TCM-199-m 中添加 3 g/L BSA 为对照, 观察极体排出率。体外受精后, 检查卵裂率。

1.6.2 无血清培养液中添加 HA 对牛胚胎发育的影响 卵母细胞在 TCM-199-m+4 mg/mL HA 培养液中培养成熟, 体外受精 48 h 后, 检出受精卵, 随机分配到 TCM-199-c (A 组), TCM-199-c+4.5 mg/mL HA (B 组), TCM-199-c+1 g/L BSA+3 mg/mL HA (C 组) 和 TCM-199-c+30 g/L BSA (CK) 中, 同颗粒细胞单层共培养, 统计各组囊胚发育率。

2 结果与分析

2.1 HA 浓度对牛卵母细胞体外成熟的影响

HA 浓度对牛卵母细胞体外成熟的影响见表 1。从表 1 可知, HA 浓度为 0 和 1.5 mg/mL 时, 两组间极体排出率和卵裂率无显著差异, 分别为 69.42%, 71.53% 和 46.73%, 48.34%, 均低于对照组且与之差异显著 ($P < 0.05$)。HA 浓度为 4.0 mg/mL 时, 极体排出率和卵裂率与对照组无显著差异 ($P > 0.05$), 但高于第 1 组和第 2 组且与之差异显著 ($P < 0.05$)。当 HA 浓度为 80 mg/mL 时, 极体排出率和卵裂率显著低于对照组和第 3 组 ($P < 0.05$), 但第一极体排出率与第 2 组差异不显著 ($P > 0.05$)。表明 HA 可代替 BSA 使卵母细胞成熟, 其最适浓度为 4.0 mg/mL。

表 1 不同浓度 HA 对牛卵母细胞体外成熟的影响

Table 1 Effect of different concentrations of hyaluronic acid on *in vitro* maturation of bovine oocytes

组别 Team	HA / (mg $\cdot$ mL $^{-1}$)	培养卵母细胞数 Number of oocyte cultured	成熟卵母细胞数 Number of oocyte maturated	第一极体排出率/% Frequency of first polar body extrusion	卵裂率/% Cleavage rate
1	0	246	171	69.42 c	46.73 b
2	1.5	252	180	71.53 bc	48.34 b
3	4.0	231	197	85.14 a	83.57 a
4	8.0	214	160	74.68 b	62.43 c
5	CK	243	217	89.47 a	85.24 a

注: 同一列中标不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$); 卵裂率以成熟卵母细胞为基数。下表同。

Note: Figures with different letter in the same column show significant difference ($P < 0.05$). Cleavage rate regard Number of oocyte maturated as the cardinal number. The following tables are the same

2.2 无血清培养液中添加 HA 对牛胚胎发育的影响

HA 对牛体外胚胎发育的影响见表 2。由表 2 可知, A 组囊胚发育率为 22.36%, 显著低于其他各组 ($P < 0.05$); B 组囊胚发育率与对照组差异不显著

($P > 0.05$), 分别为 27.64% 和 26.51%; C 组囊胚发育率 (31.19%) 显著高于其他各组 ($P < 0.05$)。表明 HA 和 BSA 对胚胎体外发育均有明显的促进作用, 且 HA 可以代替 BSA; 但是 C 组结果进一步表明, HA 和 BSA 支持胚胎发育均还有不足之处, 尚

需进一步研究。

表 2 无血清培养液中添加 HA 对牛胚胎发育效果的影响

Table 2 Contrast of developmental effect of HA on bovine embryos in serum-free medium

组别 Team	处理 Treatment	受精卵数 Cleaved eggs	囊胚总数 Total number of blastocyst	囊胚发育率/% Blastocyst rate
A	TCM -199-c	97	22	22.36c
B	TCM -199-c+ HA	112	31	27.64a
C	TCM -199-c+ HA + BSA	108	34	31.19b
CK	TCM -199-c+ BSA	102	27	26.51a

3 讨 论

HA 作为一种粘多糖不仅能够改善无血清培养基的物理特性,而且可通过降解代谢为细胞成熟和胚胎的发育提供营养与能量^[11]。Furnus 等^[12]的研究表明,HA 对卵母细胞的成熟和早期胚胎的发育有明显的促进作用,本试验亦得出相同的结果。本研究还发现,HA 浓度是影响卵母细胞极体排出率和卵裂率的重要因素之一,当 HA 浓度为 4.0 mg/mL 时,极体排出率和卵裂率显著高于其他各组 ($P < 0.05$),而且与对照组差异不显著 ($P > 0.05$);当 HA 浓度提高到 8.0 mg/mL 时,卵母细胞的成熟率和卵裂率均有所下降,与对照组差异显著 ($P < 0.05$)。表明 HA 的最适培养浓度应在 4.0 mg/mL 左右,且在牛卵母细胞无血清成熟培养中可代替 BSA,这与 Stojkovic 等^[2]的研究结果基本相同。

在 TCM -199-c 中添加 HA 可使牛早期胚胎发育到囊胚阶段^[2, 11],表明 HA 能够支持早期胚胎的发育。Stojkovic 等^[13]在合成输卵管液 (synthetic oviduct fluid, SOF) 中添加 HA 和 BSA,发现 HA 组囊胚发育率高于 BSA 组,但本试验表明 BSA 组和 HA 组差异不显著 ($P > 0.05$),这可能与所用的基础培养液不同有关,初步表明 HA 在牛胚胎无血清培养基中可以替代 BSA。本研究还表明,BSA 和 HA 联合使用更有利于牛早期胚胎的发育,培养系统比较稳定,表明 HA 支持早期胚胎发育还有不足之处,有待进一步研究。

另外,本研究获得的卵母细胞成熟率、卵裂率和囊胚发育率相对较低,可能是由卵母细胞的质量差造成的。试验所用的卵母细胞均来源于屠宰场,屠宰场离实验室较远,有时取回卵巢需要 4~6 h,而且卵巢质量也不稳定,这些都会影响卵母细胞的成熟和早期胚胎的发育。

[参考文献]

[1] Bielanski A, Dubuc C, Hare W C D. Failure to remove bovine diarrhoea virus (BVDV) from bull semen by swim-up and other separatory sperm techniques associated with *in vitro* fertilization[J]. Reproduction Domestic Animal, 1992, 27: 303- 306

[2] Stojkovic M, Thompson J G, Tervit H R. Effect of hyaluronic acid supplementation on *in vitro* development of bovine embryos in a two-step culture system[J]. Theriogenology, 1999, 51: 254- 259

[3] Lee C N, Ax R L. Concentration and composition of glycosaminoglycans in the female bovine reproductive tract[J]. Journal of Dairy Science, 1984, 67: 2006- 2009

[4] Suchanek E, Simunic V, Juretic D, et al. Follicular fluid contents of hyaluronic acid, follicle-stimulating hormone and steroids relative to the success of *in vitro* fertilization of human oocytes[J]. Fertility and Sterility, 1994, 62: 347- 352

[5] Stojkovic M, Peinl S, Stojkovic P, et al. High concentration of hyaluronic acid in culture medium increases the survival rate of frozen or thawed *in vitro* produced bovine embryos[J]. Theriogenology, 2001, 55: 317- 356

[6] Kanok K, Miyano T, Kota S. Effects of glycosaminoglycans on the development of *in vitro* matured and fertilized porcine oocytes to the blastocyst stage *in vitro*[J]. Biology of Reproduction, 1998, 58: 1226- 1232

[7] Eppig J J. FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte-cumulus cell complexes from mouse preovulatory follicles[J]. Nature, 1979, 281: 483- 484

[8] Valcarcel A, de Matos D G, Furnus C C. The hyaluronic acid receptor (CD44) is expressed in bovine oocytes and preimplantational stage embryos[J]. Theriogenology, 1999, 51: 193- 197

[9] Fraser J R E, Laurent T C, Laurent U B G. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover[J]. Journal of Internal Medicine, 1997, 242: 27- 33

[10] Marquant L e, Guienne B, Guyader-Joly C, et al. Effect of hyaluronic acid in a serum free maturation medium on bovine embryos develop-

- ment[J]. Theriogenology, 1998, 51: 386- 390
- [11] Laurent T C, Fraser J R E. Hyaluronan[J]. Journal of the Federation of American societies for Experimental Biology, 1992, 6: 2397- 2404
- [12] Furnus C C, deMatos D G, Martinez A G. Effect of hyaluronic acid on development of *in vitro* produced bovine embryos[J]. Theriogenology, 1998, 49: 1489- 1499
- [13] Stojkovic M, Thompson J G, Wenigerkind H, et al. Effect of high concentration of hyaluronic acid in culture medium increases the survival rate of frozen or thawed *in vitro* produced bovine embryos produced *in vitro*[J]. Reproduction, 2002, 124: 141- 153

Effect of hyaluronic acid on *in vitro* maturation of bovine oocytes development of early embryos

ZHAO Hong-wei¹, CHEN Xue-jin², LI Qing-wang¹, HU Jian-hong¹,
JIANG Zhong-liang¹, WANG Li-qiang¹, HAN Zeng-sheng¹

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Laboratory of Development Biology, Shanghai Second Medical University, Shanghai 250025, China)

Abstract: Some adjective ingredients were added to TCM -199, through which to determine the effect of Hyaluronic acid (HA) on *in vitro* maturation (VM) of bovine oocytes and development of the early embryos. The result showed that, there was no significant difference between control group and the group with 4 mg/mL HA in the frequency of first polar body extrusion (PB) of oocytes and cleavage rate (85.14%, 83.57% VS 89.47%, 85.24%, $P > 0.05$); It was significantly higher than other groups in PB and cleavage rate. HA was a substitute for bovine serum albumin (BSA) in serum-free medium to mature the oocytes, there was no significant difference between the group with HA and control group (BSA) (27.64% VS 26.51%, $P > 0.05$) in TCM -199-c; but it was significantly higher than other groups ($P < 0.05$). HA can improve *in vitro* development of bovine embryos in serum-free medium, while the groups with HA + BSA demonstrated significantly higher than all the groups in blastocyst rate (31.19%) ($P < 0.05$); BSA can't be replaced completely by HA on *in vitro* production of bovine embryos in serum-free medium, which is to be studied further.

Key words: hyaluronic acid; bovine oocytes; *in vitro* maturation; development of early embryo; *in vitro* culture