

人卵泡液对牛未成熟卵母细胞体外培养的影响

戴玲,江胜芳,胡冬玲,张昌军

(鄱阳医学院附属十堰市人民医院 生殖医学中心,湖北 十堰 442000)

[摘要] **【目的】**探讨以人成熟卵泡液作为体外成熟培养液培养牛卵母细胞的可能性。**【方法】**观察并比较未成熟牛卵母细胞分别在灭活人卵泡液与成熟培养液、灭活与未灭活人卵泡液、未灭活人卵泡液不同培养温度(38, 38.5和39℃)下,进行体外成熟培养时卵母细胞的极体排出率。**【结果】**在灭活人卵泡液与成熟培养液中,牛卵母细胞成熟率分别为58.5%和63.5%,二者无显著性差异($P>0.05$);在未灭活人卵泡液中,牛卵母细胞成熟率(58.8%)显著高于灭活人卵泡液(37.5%)($P<0.01$);在未灭活人卵泡液中38,38.5和39℃培养的牛卵母细胞的成熟率分别为60.7%,58.1%和54.1%,三组间差异不显著($P>0.05$)。**【结论】**人卵泡液可以用于未成熟牛卵母细胞体外成熟;人卵泡液用作成熟培养液时无需灭活,培养温度为38~39℃。

[关键词] 人卵泡液;牛卵母细胞;体外成熟

[中图分类号] Q132.8; S811.4

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2008)05-0035-04

Effects of human follicular fluid on *in vitro* maturation rate of bovine oocytes

DAI Ling, JIANG Sheng-fang, HU Dong-ling, ZHANG Chang-jun

(Reproductive Medical Research Center, People's Hospital of Shiyan, Shiyan, Hubei 442000, China)

Abstract: **【Objective】** The study was to evaluate the effect of human follicular fluid (HFF) on bovine oocytes matured *in vitro*. **【Method】** In this experiment, immature bovine oocytes were cultured in HFF and *in vitro* maturation (IVM) medium, inactivated HFF and uninactivated HFF, inactivated HFF under different temperatures (38, 38.5 and 39℃). The rates of maturing were compared. **【Result】** The rates of maturing in the HFF group (58.5%) was lower than that in the IVM medium group (63.5%), but their differences were not significant ($P>0.05$). The rates of maturing in the inactivated HFF group (37.5%) was significantly lower than that in the group (58.8%) which was not inactivated ($P<0.01$). There were also no significant differences among the rates of maturing in the three groups (38, 38.5 and 39℃) ($P>0.05$). Their rates of maturing were 60.7%, 58.1% and 54.1% respectively. **【Conclusion】** Human follicular fluid is effective in the bovine oocytes matured *in vitro*. Uninactivated HFF is more effective for culturing bovine oocytes. When using uninactivated HFF, the culture temperature should be among 38—39℃.

Key words: human follicular fluid; bovine oocyte; *in vitro* maturation

卵母细胞体外成熟是解决胚胎紧缺问题的重要途径之一,如何提高成熟率是目前研究的热点。影

响卵母细胞体外成熟的因素有培养液、培养温度、湿度、培养时间等,其中最关键的是培养液。目前,使

* [收稿日期] 2007-05-22

[基金项目] 湖北省科技厅重点项目

[作者简介] 戴玲(1981—),女,湖北汉川人,在读硕士,主要从事中西医结合治疗不孕不育研究。E-mail: dllk@ sina. com

[通讯作者] 张昌军(1961—),男,湖北十堰人,教授,硕士生导师,主要从事人类胚胎研究。

用的培养液大多是在 TCM 199 中添加血清、生长因子^[1-2](EGF、IGF-1)、外源性激素^[3](如 FSH、LH、E₂、PMSG、HCG 等)和其他因子^[4](如尿嘧啶和三价因子),且多采用不同激素与生长因子混合添加的方式。然而生长因子和激素价格昂贵,在提高生产效率的同时也使得生产成本大大提高。因此,寻找效率高而成本低的培养液,成为卵母细胞体外成熟研究的新热点。

成熟卵泡液含有卵母细胞成熟所需的全部物质,理论上牛卵泡液是牛卵母细胞体外成熟的最理想培养基,然而研究发现,牛卵泡液中含有成熟分裂抑制因子^[5],可以通过透明带的微绒毛与卵母细胞质膜间隙连接进入卵母细胞,或通过卵泡液直接吸收,从而对牛卵母细胞的体外成熟产生抑制作用。Dostal 等^[6]从牛卵泡液中分离获得了牛卵母细胞成熟抑制因子。因此,牛卵泡液不能作为培养液使用。而人成熟卵泡液中也含有卵母细胞成熟的物质,但人的卵泡液是否可以用作牛卵母细胞体外成熟的培养液,至今尚未见报道。为此,本研究以人成熟卵泡液作为体外成熟培养液,研究了其对牛卵母细胞体外成熟率的影响,以寻找一种能有效降低生产成本的新培养液。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 人卵泡液(HFF)的获取与处理 卵泡液来自在湖北省十堰市人民医院生殖中心行 IVF 助孕的妇女,均为单纯输卵管性不孕,年龄 29~34 岁,月经规律。采用该中心常规方案调节,超促排卵,当卵泡达直径 18 mm 时注射 HCG 5 000 U,35 h 后取卵。在取卵日,选直径>14 mm、内含健康成熟卵子的卵泡取卵泡液,待回收卵母细胞后立即收集卵泡液,将卵泡液放在离心管内 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液。收集 3 例患者的卵泡液混合。卵泡液混合后分 2 管,1 管立即分装到无菌小试管中,每管 2 mL,封口膜封口,-20 ℃ 储存备用,用放射免疫法检测其中 E₂、P、FSH 和 LH 的含量;另 1 管置 56 ℃ 水浴锅灭活 30 min,分装到无菌小试管中,每管 2 mL,-20 ℃ 储存备用。使用前将卵泡液解冻,在盖有盖平皿中制作 7~10 个 80 μL 的液滴,其上覆盖矿物油,于 38 ℃、体积分数 5% CO₂ 恒温培养箱中平衡 6 h。

1.1.2 牛卵巢的采集 试验用牛卵巢均采自屠宰场当日屠宰的母牛。将采得的卵巢用 37 ℃ 生理盐

水冲洗 2 遍,置于装有 37 ℃ 生理盐水的保温桶内,在 3 h 内运回实验室,使用前再次用生理盐水洗涤。

1.1.3 试 剂^[7] (1)TCM 199 培养液。TCM 199 粉末(Gibco)10 g+NaHCO₃(Sigma)2.75 g,用 1 L 三蒸水定容,调节 pH 值为 7.2~7.4,正压过滤灭菌,4 ℃ 保存。

(2)显微操作液。在 TCM 199 培养液中加入胎牛血清 FCS(Gibco),体积分数 10%。

(3)无钙 DPBS。PBS 粉末 10 g,三蒸水溶解定容到 1 L,调节 pH 值为 7.0~7.2,用 0.2 μm 滤膜过滤灭菌,4 ℃ 保存。

(4)抽卵液。无钙 DPBS 溶液中加入 FCS,体积分数 10%。

(5)透明质酸酶。透明质酸酶(Sigma)0.2 g,溶于 100 mL 无钙 DPBS 溶液中,过滤灭菌,-20 ℃ 贮存。

(6)成熟培养液(IVM)。TCM 199 培养液+体积分数 10% FCS+10 U/mL FSH(Sigma)+100 U/mL LH(Sigma)+1 μg/mL estradiol(Sigma)+双抗(100 U/mL 青霉素,100 U/mL 链霉素)。

1.2 牛卵母细胞的采集

用 10 mL 注射器和 20 G 针头,从牛卵巢表面的直径为 2~8 mm 卵泡中抽取卵冠丘复合体(COCs),将抽取的 COCs 放入抽卵液中。

1.3 牛卵母细胞的体外成熟及卵泡液的制备

在体视显微镜下选取胞质均匀、卵丘细胞致密的 COCs,置于抽卵液中洗 3 次,备用。将回收 COCs 后剩下的牛卵泡液收集,置离心管中 3 000 r/min 离心 10 min,取上清,置无菌小试管中,用放射免疫法检测其中 E₂、P、FSH 和 LH 的含量。

1.4 人卵泡液和牛卵泡液中激素含量的测定

碘 125-E₂、碘 125-P、碘 125-FSH、碘 125-LH 放射免疫检测试剂盒均购自深圳拉尔文生物工程技术公司,批内变异系数小于 10%,采用放射免疫法检测人和牛卵泡液中的激素含量。

1.5 人卵泡液对未成熟牛卵泡细胞体外成熟的影响

1.5.1 成熟培养液(IVM)与灭活人卵泡液的影响 将抽卵液中洗过的 COCs 随机分为 2 组,分别在灭活人卵泡液和成熟培养液中洗涤 3 次后,移入相应培养液液滴(80 μL)中,每滴 10 枚 COCs,放入 38 ℃、体积分数 5% CO₂、100%湿度恒温培养箱中培养 22 h。

1.5.2 灭活与未灭活人卵泡液的影响 将抽卵液

中洗过的 COCs 随机分为 2 组,分别在灭活和未灭活人卵泡液中洗涤 3 次后,移入培养液液滴(80 μ L)中,每滴 10 枚 COCs,放入 38 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO_2 、100%湿度恒温培养箱中培养 22 h。

1.5.3 在不同温度条件下未灭活人卵泡液的影响
将抽卵液中洗过的 COCs 随机分为 3 组,在未灭活人卵泡液中洗涤 3 次后,移入培养液液滴(80 μ L)中,每滴 10 枚 COCs,分别放入体积分数 5% CO_2 、湿度 100%、培养温度分别为 38,38.5 和 39 $^{\circ}$ C 的恒温培养箱中培养 22 h。

1.6 牛卵母细胞体外成熟率的计算

将成熟培养 22 h 后的 COCs,放入 2 g/L 的透明质酸酶中消化 1 min,然后置离心管中,涡旋振荡

器上振荡 1 min,用仅比卵母细胞大几微米的细管将卵母细胞反复吸入吹出,以去除卵丘细胞。成熟率/%=排出第一极体的卵数/培养卵数 $\times$ 100%。

1.7 统计分析

成熟率差异显著性分析采用卡方检验, $P<0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果与分析

2.1 人卵泡液(HFF)与牛卵泡液(BFF)中的激素含量

由表 1 可知,人卵泡液中各种激素含量均高于牛卵泡液,但由于本试验使用的卵泡液较少,未能进行统计学分析。

表 1 未灭活人卵泡液和牛卵泡液中的激素含量

Table 1 Hormone concentrations in BFF and HFF

组别 Group	FSH/(mIU $\cdot$ mL $^{-1}$)	LH/(mIU $\cdot$ mL $^{-1}$)	P/(ng $\cdot$ mL $^{-1}$)	E $_2$ /(pg $\cdot$ mL $^{-1}$)
HFF	11.10	15.90	2 447.0	7 032.0
BFF	0.19	0.18	129.7	3 384.7

2.2 牛卵母细胞在成熟培养液(IVM)与灭活人卵泡液中的成熟率

由表 2 可知,培养 22 h 后,成熟液组 173 个牛卵母细胞中有 110 个(63.5%)有极体排出,灭活人卵泡液组 118 个牛卵母细胞中有 68 个(58.5%)有极体排出,两组比较差异不显著($P>0.05$)。

表 2 不同培养液对牛卵母细胞体外成熟的影响

Table 2 Effect of different culture media on *in vitro* maturation of bovine oocytes

组别 Group	COCs 数 No. of COCs	成熟卵数 No. of mature oocytes	成熟率/% Matured rates
灭活 FF Inactivated FF	118	68	58.5
IVM	173	110	63.5

2.3 牛卵母细胞在灭活与未灭活人卵泡液中的成熟率

由表 3 可知,培养 22 h 后,灭活组 208 个牛卵母细胞中有 76 个(37.5%)有极体排出,未灭活组 170 个牛卵母细胞中有 100 个(58.8%)有极体排出,两组比较差异极显著($P<0.01$)。

2.4 牛卵母细胞在未灭活人卵泡液中不同培养温度下的成熟率

由表 4 可知,培养 22 h 后,38 $^{\circ}$ C 组 155 个牛卵母细胞中有 94 个(60.7%)有极体排出,38.5 $^{\circ}$ C 组 105 个牛卵母细胞中有 61 个(58.1%)有极体排出,39 $^{\circ}$ C 组 159 个牛卵母细胞中有 86 个(54.1%)有极体排出,3 组间成熟率没有显著差异($P>0.05$)。

表 3 灭活与未灭活人卵泡液对牛卵母细胞体外成熟的影响

Table 3 Effect of inactivated and uninactivated HFF on *in vitro* maturation of bovine oocytes

组别 Group	COCs 数 No. of COCs	成熟卵数 No. of mature oocytes	成熟率/% Mature rates
灭活 FF inactivated FF	208	76	37.5
未灭活 FF uninactivated FF	170	100	58.8

表 4 未灭活人卵泡液中不同培养温度对牛卵母细胞体外成熟的影响

Table 4 Effect of different culture temperatures on *in vitro* maturation of bovine oocytes when cultured in unactivated HFF

培养温度/ $^{\circ}$ C Culture temperature	COCs 数 No. of COCs	成熟卵数 No. of mature oocytes	成熟率/% Mature rates
38.0	155	94	60.7
38.5	105	61	58.1
39.0	159	86	54.1

3 讨 论

卵泡液作为卵母细胞发育的微环境,在卵母细胞发育中起主要调节作用。卵泡液含有大量来自血清的生化因子和来自卵母细胞及卵泡细胞的分泌因子,对卵母细胞成熟有一定的影响。Ayoub 等^[8]研究认为,卵泡液能抑制牛卵母细胞成熟分裂的启动。崔亚力等^[9]研究发现,添加体积分数 10%和 30%卵泡液代替血清,卵母细胞体外培养成熟率显著降低($P<0.01$),20%添加量成熟率略有降低,但差异不显著。研究者在牛卵泡液对牛卵母细胞减数分裂核

成熟具有抑制作用上,已经形成了共识,并在牛卵泡液中分离获得了卵母细胞减数分裂抑制因子 OMI^[6,8]。牛卵泡液被证实不能用于未成熟牛卵母细胞的体外成熟培养。人的成熟卵泡液中同样含有大量来自血清的生化因子和来自卵母细胞及卵泡细胞的分泌因子,且其中激素含量明显高于牛卵泡液中同类激素及因子的含量。本试验结果显示,用灭活人卵泡液和成熟培养液培养的牛卵母细胞,成熟率没有显著差异。这说明人成熟卵泡液可以作为牛卵母细胞的体外成熟培养液,且对牛卵母细胞的体外成熟有促进作用。

人们通常采用 56℃ 灭活的方法,消除血清中含有的细胞毒性物质对卵母细胞发育的影响^[10]。目前很多研究者也采用灭活的方法处理组织液,其中包括了卵泡液。然而 Tam 等^[11]认为,血清热处理在灭活了补体的同时,也会破坏有利于卵母细胞和胚胎发育的多种成分,特别是热稳定性差的生物活性物质。本试验研究表明,卵泡液灭活与否对卵母细胞第一极体的排出有显著影响,可能是灭活过程破坏了卵泡液中参与卵母细胞成熟的热稳定性差的生物活性物质,造成卵母细胞核成熟障碍。

在卵泡卵母细胞体外成熟培养研究的初期,培养温度多采用 37℃。后来研究发现,不同的培养温度对体外成熟的影响很大,不同动物体外成熟温度不同,在接近体温的温度下培养效果较好,因此牛多用 39℃^[12]。本试验选用 38,38.5 和 39℃ 3 种温度培养牛卵母细胞,结果表明,未灭活人卵泡液培养牛未成熟卵母细胞,温度控制在牛的正常体温范围内对卵母细胞的成熟率没有显著影响。

卵母细胞的成熟,不仅包括了细胞核的成熟(第一极体的排出是核成熟的标志),而且包括了细胞质的成熟^[13]。由于试验条件的限制,本试验仅观察了人卵泡液对未成熟牛卵母细胞核成熟的影响,未能观察其对细胞质成熟的影响。关于人卵泡液对牛未成熟卵母细胞细胞质成熟的影响,仍有待于进一步研究。

[参考文献]

[1] 吴凯峰. EGF、IGF-I 和相应的受体在牛早期胚胎中的表达及对卵母细胞体外成熟的影响 [D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2004.
Wu K F. Expression of EGF-R, IGF- I and IGF- I R in bovine preimplantation embryo and effect of EGF、IGF- I on maturation of bovine oocyte *in vitro* [D]. Hohhot: Inner Mongolia university, 2004. (in Chinese)

[2] 李向臣, 丛日华, 安志兴, 等. EGF 和 FBS 对牛孤雌胚胎发育的

影响 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2004, 32(4): 51-54.

Li X C, Cong R H, An Z X, et al. The influence of EGF and FBS on parthenogenetic embryo proliferation of bovine [J]. Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry: Natural Science Edition, 2004, 32(4): 51-54. (in Chinese)

[3] 田万强, 曾林森, 林清, 等. 不同培养条件对牛卵母细胞体外成熟的影响 [J]. 中国牛业科学, 2007 (4): 18-21.
Tian W Q, Zan L S, Lin Q, et al. The effects of different culture on IVM of oocytes in cattle [J]. China Cattle Science, 2007 (4): 18-21. (in Chinese)

[4] 王洪锋, 王晓磊, 于海生, 等. 尿嘧啶、三价因子和 ATP 对牛卵母细胞体外成熟的影响 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2006, 34(6): 21-24.
Wang H F, Wang X L, Yu H S, et al. The effect of uracil and ITS on the bovine IVM oocytes [J]. Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry: Natural Science Edition, 2006, 34(6): 21-24. (in Chinese)

[5] Sirard M A, First N L. *In vitro* inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine [J]. Biol Reprod, 1988, 39: 229-234.

[6] Dostal J, Pavlok A. Isolation and characterization of maturation inhibiting compound in bovine follicular fluid [J]. Reprod Nutr Dev, 1996, 36(6): 681-690.

[7] 李世杰, 李 宁. 发育相关基因在新生死亡体细胞克隆牛中的表达 [D]. 北京: 中国农业大学, 2004.
Li S J, Li N. Aberrant gene expression in cloned bovine of neonatal death [D]. Beijing: China Agriculture University, 2004. (in Chinese)

[8] Ayoub M A, Hunter A G. Inhibitory effect of bovine follicular fluid on *in vitro* maturation of bovine oocytes [J]. J Dairy Sci, 1993, 76: 95-100.

[9] 崔亚力, 桑润滋. 牛卵母细胞体外成熟及体外受精的研究 [J]. 河北农业大学学报, 1999, 22(1): 67-70.
Cui Y L, Sang R Z. Study on bovine oocyte *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization [J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 1999, 22(1): 67-70. (in Chinese)

[10] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养 [M]. 北京: 世界图书出版公司, 1996.
Situ Z Q, Wu J Z. Cell culture [M]. Beijing: World Publishers, 1996. (in Chinese)

[11] Tam P P, Snow M H. The *in vitro* culture of primitive-streak-stage mouse embryos [J]. Embryo Exp Morphol, 1980, 59: 131-143.

[12] Ravindranatha B M, Nandi S, Raghu H M, et al. *In vitro* maturation and fertilization of buffalo oocytes effects of storage of ovaries, IVM temperatures, storage of processed sperm and fertilization media [J]. Reprod Domest Anim, 2003, 38(1): 21-26.

[13] 徐 晨, 周作明. 生殖生物学理论与实践 [M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2005.
Xu C, Zhou Z M. Reproducture biology theory and practice [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Literature Pulishers, 2005. (in Chinese)