

人卵母细胞体外成熟培养研究进展^{*}

王洪锋¹, 师娟子², 刘金萍², 周寒鹰², 窦忠英¹

(1 西北农林科技大学 国家干细胞工程技术研究中心 陕西分中心, 陕西 杨凌 712100;

2 陕西省妇幼保健院, 陕西 西安 710003)

[摘 要] 卵母细胞体外成熟是辅助生殖的基础, 提高人卵母细胞的体外成熟率可为胚胎移植病人提供更多优质的胚胎。影响人卵母细胞体外成熟率的因素主要包括: 年龄、体外培养时间及体外培养系统等。文章对人卵母细胞体外成熟的机理、影响卵母细胞体外成熟的因素进行了综述, 最后对卵母细胞体外成熟的临床意义进行了展望。

[关键词] 人; 卵母细胞; 体外成熟培养; 成熟机理; 影响因素; 临床意义

[中图分类号] Q 813.1⁺1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)07-0032-05

1935年, Pincus等^[1]在对兔卵母细胞进行体外培养时发现, 部分初级卵母细胞可在体外培养条件下排出第一极体, 完成卵母细胞的成熟过程, 这为生殖工程开辟了一个新领域——卵母细胞体外成熟(In Vitro Maturation, VM)。1965年Edwards^[2]开始卵母细胞体外成熟的研究, 但直到1991年, Cha等^[3]才成功地从自然月经周期中获得了人未成熟卵母细胞, 并进行了卵母细胞体外成熟研究, 进而通过体外受精-胚胎移植技术(In Vitro Fertilization-Embryonic Transfer, IVF-ET)治疗临床不孕症患者。2004年Chian等^[4-5]报道, VM卵母细胞的临床妊娠率和种植率分别为30%~35%和10%~15%。到目前为止, 世界上采用该技术分娩的婴儿约有300个。

卵母细胞体外成熟的优点是不需要超促排卵, 从而避免了超促排卵过程中产生的过多的雌激素(E₂), 减少了卵巢过度刺激综合征(Ovarian Hyperstimulation Syndrome, OHSS)的发生, 降低了患者的费用^[6]。本文对卵母细胞体外成熟的机理及影响卵母细胞体外成熟的主要因素进行了分析, 以供相关研究人员参考。

1 卵母细胞的成熟机理

1.1 胞核成熟

虽然目前尚不完全清楚排卵前促黄体生成素

(Luteinizing Hormone, LH)峰如何启动生发泡破裂(Geminal Vesicle Breakdown, GVBD), 但已明确有许多潜在因素通过卵丘细胞来控制GVBD。卵母细胞与卵丘细胞之间通过缝隙连接相通, 这提示颗粒细胞可能通过卵丘细胞来控制GVBD。缝隙连接允许一些调节分子, 如类固醇、Ca²⁺、1, 4, 5-三磷酸肌醇(Inositol 1, 4, 5-Trisphosphate, IP3)、环磷酸腺苷(cyclic Adenosine Monophosphate, cAMP)和嘌呤等在卵母细胞胞浆和卵丘细胞胞浆之间自由出入。来源于卵泡颗粒细胞及卵泡膜细胞的cAMP通过缝隙连接进入卵母细胞。cAMP对GVBD有2种调节方式: 一种方式是持续高浓度的cAMP能阻止GVBD的发生^[7]; 另一种方式是在LH刺激下, cAMP浓度的升高则能促进GVBD的发生。

然而生发泡破裂后, 并不是所有的卵母细胞都能释放第一极体即核成熟。其主要原因是成熟促进因子(Maturation Promoting Factor, MPF)不能被激活, 从而抑制卵母细胞内蛋白质的合成, 导致发育停滞。

有丝分裂原活化的蛋白激酶(Mitogen-Activated Protein Kinase, MAPK)是调节卵母细胞减数分裂阻滞的关键因子。Catherine等^[8]报道, 当将卵丘细胞植入到一种三维材料中用于支持裸卵成熟时, 与裸卵相比, 这种联合培养卵母细胞的MAPK水平很高, 而MPF水平无变化。MAPK在人未成熟卵

^{*} [收稿日期] 2005-09-14

[基金项目] 国家“863”计划项目(2002AA216161); 教育部重大项目(03160); 国家自然科学基金项目(302000137)

[作者简介] 王洪锋(1979-), 男, 吉林通化人, 在读硕士, 主要从事胚胎工程及试管婴儿研究。

[通讯作者] 窦忠英(1939-), 男, 陕西兴平人, 教授, 博士生导师, 主要从事哺乳动物胚胎工程和干细胞工程研究。

E-mail: douzhongying@china.com

母细胞中无活性,但在成熟卵母细胞中有活性,受精及原核形成后其活性均降低。目前,对GVBD的机理和排卵前卵母细胞在LH峰的诱导下进入第二次减数分裂中期的信号传导路径尚不清楚。

1.2 胞浆成熟

卵母细胞内集聚大量的mRNA和蛋白质是卵母细胞成熟的基本条件,二者可以催化MPF的扩增,使卵母细胞进入分裂期(GII-M),同时生成大量的LH和人绒毛膜促性腺激素(human Chorionic Gonadotropin, hCG),调节减数分裂过程。Wasserman等^[9]报道,在为期1h的GVBD中,RNA以低水平不断合成,而且一些新合成的RNA在生发泡破裂前释放到胞浆中去。De La Fuente等^[10]报道,RNA、蛋白质和印迹基因共同作用于卵母细胞的胞质,同时能维持胚胎DNA表达开始前的胚胎发育。在卵母细胞生长前期,mRNA迅速启动表达并高效转录和翻译,在卵泡生长末期尤其是排卵前,停止翻译并被降解。所以,卵母细胞和早期胚胎依赖于排卵前期积累的蛋白和mRNA。Picard等^[11]认为,除了mRNA和蛋白质,胞质成熟的因素还包括母体遗传背景对基因重甲基化的程度、基因表达和先天异常的作用等。Nogueira等^[12]认为,在卵母细胞成熟液中,添加磷酸二酯酶3型抑制因子(Phosphodiesterase Type 3-Inhibitor, PDE3-I)等减数分裂抑制剂,可使胞质与胞膜成熟同步。

哺乳类动物卵母细胞提供的蛋白质不仅是受精卵开始分裂所必需的,也调节着受精后父系基因组的表达。如果卵母细胞胞浆未充分成熟,将导致雄性原核不能激活,使受精后染色体异常。Yu等^[13]报道,Y-box蛋白家族的MSY2蛋白能在生长期卵母细胞中表达,是卵母细胞中最丰富的蛋白之一。但是,对卵母细胞成熟过程中母体特异性分子积累的详细机理仍不清楚。

促卵泡激素(Follicle Stimulating Hormone, FSH)作用于颗粒细胞,使其分泌多种物质,这些物质不仅调控卵母细胞的核成熟,而且对卵母细胞胞浆的成熟也起着重要的作用。其作用机理是,FSH与颗粒细胞上的FSH受体结合,进而通过cAMP依赖的蛋白激酶通路发挥作用。

特异性蛋白质的合成既是胞浆成熟必需的,也是MPF激活和GII-M过程的标志。在特异性蛋白质合成过程中,胞浆细胞器重新定位,膜运输系统发生变化。如果这个过程未完成,将导致妊娠失败。

1.3 胞膜成熟

卵母细胞胞膜不仅能防止多精子受精,而且还能选择性透过一些小分子物质调节卵母细胞的成熟。Boldt等^[14]研究发现,卵母细胞胞膜表面存在精子受体。Tesarik等^[15]报道,雌激素可能作用于卵母细胞胞膜表面,在胞膜成熟时引起 Ca^{2+} 释放系统的改变。Ji等^[16]指出,在卵母细胞成熟过程中,尽管胞膜蛋白的总量下降很快,但相对分子量为71 ku的蛋白的含量在GV期、MI期和MII期均表现为升高,分别为9.9%、13.1%和27.4%。尽管上述现象的机理还不完全清楚,但它们可能与卵母细胞胞膜的成熟有关。Sezen等^[17]研究发现,从初级卵母细胞到MII期卵母细胞,其胞膜表面微绒毛的数量不断增多,微绒毛长度逐渐增加,至完全成熟后微绒毛数量下降。表明卵母细胞活化与胞膜成熟有关,而且对精子穿过卵母细胞膜完成受精也有作用。

2 不同来源卵母细胞的体外成熟培养

2.1 原始卵泡或腔前卵泡

Abir等^[18]在对从成人卵巢得到的腔前卵泡培养时发现,4周后卵泡的直径增至120 μm ,但仅有20%的卵泡中含有卵母细胞,而且得到的这些卵母细胞存活率很低。在卵母细胞体外成熟培养开始时,如果卵丘卵母细胞复合物(OCCs)的直径大于190 μm ,则原始卵泡只能发育到早期窦卵泡阶段。

2.2 从激素刺激周期得到的卵母细胞

常规促排卵的方法是,先给患者注射适量促性腺激素(Gonadotrophin, Gn),当优势卵泡直径达18~22 mm时,再给患者注射hCG 10 000 IU超促排卵,36 h后取卵,进行体外培养。Kim等^[19]研究认为,用激素刺激方法能得到大约85%~90% MII期卵母细胞和10%~15% MI期或GV期卵母细胞。但不同时期(GV期、MI期及MII期)的卵母细胞由于受相同剂量激素的刺激,其显微结构可能发生变化,导致卵母细胞发育不同步。Cha等^[20]发现,采用激素刺激得到的卵母细胞第一个GVBD发生在体外培养6 h之后,而未采用激素刺激的卵母细胞第一个GVBD发生在体外培养12~15 h之后。

2.3 控制性超促排卵

目前,为了增加可移植的胚胎数,大部分体外受精(In Vitro Fertilization, IVF)中心均采用激素刺激的方法提高采卵数,但每个周期能得到多少枚胚胎还不清楚。一般从月经第3天开始,给多囊卵巢综合征(Polycystic Ovary Syndrome, PCO)患者每人

注射 FSH 75 IU/d, 连续注射 6 d 后, 在月经的 10~14 d 取卵, 取卵前 36 h 给患者注射 hCG 10 000 IU。用 B 超检测子宫内膜厚度及卵泡大小, 如果发现在注射 hCG 当日, 卵泡直径 > 10 mm 或者取卵时其直径达 12 mm, 则取消本次取卵。Hreinsson 等^[21]认为, 在进行 IVF 时, 应保证至少有 1 个直径为 10~14 mm 大卵泡。但 Lin 等^[22]研究发现, 采用 FSH 促排组的成熟率、受精率和妊娠率分别为 76.5%, 75.8% 和 31.4%, 而未采用 FSH 促排组的成熟率、受精率和妊娠率分别为 71.9%, 69.5% 和 36.4%, 二者差异不显著。说明采用 FSH 促排对 IVF 的成功率没有显著影响。

2.4 自然周期得到的卵母细胞

由于一些患者对促排卵激素敏感, 容易导致卵巢过度刺激综合征和一些副作用, 从而影响患者的身体健康。从自然月经周期中取卵, 能够避免卵巢过度刺激, 并使治疗更加简单。Cha 等^[23]报道, 年龄、月经周期的天数等均会影响获得未成熟卵母细胞的数量。Barnes 等^[24]发现, 来自月经周期规则患者卵母细胞的分裂率比来自月经周期不规则患者高。Chian 等^[25]通过动物模型也发现, 卵巢中的优势卵泡不会影响其他未成熟卵母细胞的质量及早期胚胎的发育。

3 影响卵母细胞体外成熟培养的因素

3.1 年龄

随着年龄的增长, 卵巢上的卵母细胞数量及可获得的未成熟卵母细胞数量均逐渐减少。由于年龄增长, 卵巢内的氧自由基会累积并影响卵母细胞的质量, 从而导致减数分裂时染色体异常运动产生非整倍体, 使卵母细胞发育潜能下降^[26]。一般 21~30 岁患者卵母细胞体外成熟培养的成熟率最高, 41~50 岁患者的最低。随着年龄的增大, 临床获得卵母细胞率及可用移植胚胎数目均会下降, 从而导致 IVF 成功率降低。

3.2 采卵时间

关于采卵时间还是个有争议的问题, 一般取自月经增生期成熟度比较高的卵母细胞。但 Cha 等^[20]认为, 取自月经周期增生期和分泌期的卵母细胞体外成熟率并无差别, 只是增生期的取卵数目较多。

3.3 体外培养时间

目前对卵母细胞体外成熟培养时间尚无定论, 一般认为约为 28~32 h, 但也有人认为, 要根据卵母细胞成熟度来确定, 从自然月经周期取得的未成

熟卵母细胞, 一般要经过 32~48 h 的体外培养^[27]。Son 等^[28]报道, 体外培养时第 2 天成熟卵母细胞的分裂率及囊胚率(91.5%, 50.4%)均极显著高于第 3 天成熟的卵母细胞(72.2%, 19.0%)。这说明在体外培养时越早发育到 M II 期的卵母细胞, 其后期的分裂率及囊胚率越高。这可能由于长时间的体外培养, 一方面导致卵母细胞胞浆内的营养物质不足, 另一方面造成其老化、死亡。

3.4 体外培养体系

目前尚无统一的体外培养体系, 各体系培养液的成分及含量均不相同。Chian 等^[25]报道的培养体系为: TCM 199+ 体积分数 10% 合成血清替代物+ 0.075 IU/mL rFSH + 0.075 IU/mL hCG + 1.0 mg/mL E₂ + 0.25 mmol/L 丙酮酸钠 + 1 mmol/L 谷氨酸。Hreinsson 等^[21]报道的培养体系为: TCM 199+ 体积分数 10% 病人血清+ 0.3 mmol/L 丙酮酸+ 0.075 IU/mL rFSH + 0.05 mg/mL 青霉素+ 0.5 IU/mL rLH + 0.075 mg/mL 链霉素, 此培养体系中卵母细胞的成熟率为 56%。

4 卵母细胞体外成熟培养的临床意义

4.1 临床治疗

自 1991 年 Cha 等^[3]首次报道卵母细胞体外成熟培养技术与显微受精技术结合治疗不孕症获得成功以来, 有关 IVF 结合 IVF 或卵胞浆单精子注射(ICSI)成功地应用于临床的报道越来越多。Sanderstrom-Anttila 等^[29]报道, 无论是自然月经周期还是 PCO 患者获得的卵母细胞, 通过 IVF-IVF 及 IVF-ICSI 均可得到良好的妊娠结果。Friden 等^[30]报道, 在自然月经周期中获得了 3 枚卵母细胞, 经体外成熟、移植后获得了 1 个健康的胎儿。这种方法既免除了病人的痛苦及发生卵巢过度刺激综合征的危险, 又节省了医疗费用, 减轻了患者的负担。

Demirci 等^[31]报道, 冷冻保存的卵巢可以进行自体及异体移植, 或者为 IVF 提供原始卵泡。利用 IVF-IVF-ET 等方法, 结合卵巢皮质组织冻存, 为面临早绝经(Turner's 综合征家族性早绝经)、卵巢早衰(Premature Ovary Failure, POF)及肯定将不孕(肿瘤治疗后或者严重子宫内膜异位症治疗后)的年轻妇女提供了生育希望。而且还可以为患有严重遗传病的患者提供正常的胚胎, 防止遗传病传至下一代。

4.2 建立卵母细胞库

Stachecki 等^[32]和 Gosden^[33]报道, 冻存卵母细胞将为那些面临卵巢去势(手术切除、化疗及放疗)

的患者提供一种保存生育能力的途径。NM 技术与卵母细胞冷冻结合, 将有助于卵母细胞库的建立。

[参考文献]

- [1] Pincus G, Enzmann E V. The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro* I. The activation of ovarian eggs[J]. J Exp Med, 1935, 62: 665-675
- [2] Edwards R G M. Maturation *in vitro* of human ovarian oocytes[J]. Lancet, 1965, 2(7419): 926-929
- [3] Cha K Y, Koo J J, Ko J J, et al. Pregnancy after *in vitro* fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture *in vitro* and their transfer in a donor oocyte program [J]. Fertil Steril, 1991, 55(1): 109-113
- [4] Chian R C. *In-vitro* maturation of immature oocytes for infertile women with PCOS[J]. Reprod Biomed Online, 2004, 8(5): 547-552
- [5] Chian R C, Lin J H, Tan S L. State of the art in *in-vitro* oocyte maturation[J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2004, 16(3): 211-219
- [6] Hreinsson J, Fridstrom M. *In vitro* oocyte maturation for safer treatment of infertility. The risk of ovarian overstimulation syndrome is minimized[J]. Lakartidningen, 2004, 1(46): 3665-3668
- [7] Tornell J, Hillensjö T. Effect of cyclic AMP on the isolated human oocyte-cumulus complex[J]. Hum Reprod, 1993, 8: 737-739
- [8] Catherine M H, Combelles R A, Fissore D F, et al. *In vitro* maturation of human oocytes and cumulus cells using a co-culture three-dimensional collagen gel system [J]. Hum Reprod, 2005, 20: 1349-1358
- [9] Wassaman P M, Letourneau G E. RNA synthesis in fully grown mouse oocytes[J]. Nature, 1976, 361: 73-74
- [10] De La Fuente R, Eppig J J. Transcriptional activity of the mouse oocyte genome: companion granulosa cells modulate transcription and chromatin remodeling[J]. Developmental Biology, 2001, 229: 224-236
- [11] Picard B, Dean W, Engemann S, et al. Epigenetic targeting in the mouse zygote marks DNA for later methylation: a mechanism for maternal effects in development[J]. Mechanisms of Development, 2001, 103: 35-47
- [12] Nogueira D, Cortvriendt R, Everaerd B, et al. Effects of long-term *in vitro* exposure to phosphodiesterase type-3 inhibitors on follicle and oocyte development[J]. Reproduction, 2005, 130: 177-186
- [13] Yu J, Hecht N B, Schultz R M. Expression of MSY2 in mouse oocytes and preimplantation embryos[J]. Biology of Reproduction, 2001, 65(4): 1260-1270
- [14] Boldt J, Howe A M, Preble J. Enzymatic alteration of the ability of mouse egg plasma membrane to fuse with sperm [J]. Biology of Reproduction, 1988, 39(1): 19-27
- [15] Tesarik J, Mendoza C. Nongenomic effects of 17 β -estradiol on maturing human oocytes: relationship to oocyte developmental potential [J]. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 1995, 80: 1438-1443
- [16] Ji Y Z, Bomsel M, Jouannet P, et al. Modifications of the human oocyte plasma membrane protein pattern during preovulatory maturation [J]. Molecular Reproduction and Development, 1997, 47: 120-126
- [17] Sezen S C, Cincik M. Oocyte membrane maturation and oocyte-sperm relationship: transmission electron microscopy study[J]. Arch Androl, 2003, 49(4): 297-305
- [18] Abir R, Franks S, Mobberley M A, et al. Mechanical isolation and *in vitro* growth of preantral and small antral human follicles[J]. Fertil Steril, 1997, 68(4): 682-688
- [19] Kim B K, Lee S C, Kim K J, et al. *In vitro* maturation, fertilization, and development of human germinal vesicle oocytes collected from stimulated cycles[J]. Fertil Steril, 2000, 74(6): 1153-1158
- [20] Cha K Y, Chian R C. Maturation *in vitro* of immature human oocytes for clinical use[J]. Hum Reprod Update, 1998, 4(2): 103-120
- [21] Hreinsson J, Rosenlund B, Friden B, et al. Recombinant LH is equally effective as recombinant hCG in promoting oocyte maturation in a clinical *in-vitro* maturation programme: a randomized study[J]. Hum Reprod, 2003, 18(10): 2131-2136
- [22] Lin Y H, Hwang J L, Huang L W, et al. Combination of FSH priming and hCG priming for *in-vitro* maturation of human oocytes[J]. Hum Reprod, 2003, 18(8): 1632-1636
- [23] Cha K Y, Do B R, Chi H J, et al. Viability of human follicular oocytes collected from unstimulated ovaries and matured and fertilized *in vitro*[J]. Reproduction, Fertility and Development, 1992, 4: 695-701
- [24] Barnes F L, Kausche A, Tiglias J, et al. Production of embryos from *in vitro* matured primary human oocytes[J]. Fertil Steril, 1996, 65(6): 1151-1156
- [25] Chian R C, Tan S L. Maturation and developmental competence of cumulus-free immature human oocytes derived from stimulated and intracytoplasmic sperm injection cycles[J]. Reprod Biomed Online, 2002, 5: 125-132
- [26] Mikkelsen A L, Smith S, Lindenberg S. Possible factors affecting the development of oocytes in *in-vitro* maturation[J]. Hum Reprod, 2000, 15(Suppl 5): 11-17
- [27] 黄荷凤. 现代辅助生育技术[M]. 北京: 人民军医出版社, 2003: 239-252
- [28] Son W Y, Lee S Y, Lin J H. Fertilization, cleavage and blastocyst development according to the maturation timing of oocytes in *in vitro*

- maturation cycles[J]. Hum Reprod, 2005, 20(11): 3204-3207.
- [29] Sander M, Anttila V, Mäkinen S, Tuuri T, et al. Favourable pregnancy results with insemination of *in vitro* matured oocytes from unstimulated patients[J]. Hum Reprod, 2005, 20(6): 1534-1540.
- [30] Friden B, Hreinsson J, Hovatta O. Birth of a healthy infant after *in vitro* oocyte maturation and ICSI in a woman with diminished ovarian response: Case report[J]. Hum Reprod, 2005, 20(9): 2556-2558.
- [31] Demirci B, Lornage J, Salle B, et al. The cryopreservation of ovarian tissue: uses and indications in veterinary medicine[J]. Theriogenology, 2003, 60(6): 999-1010.
- [32] Stachecki J J, Cohen J. An overview of oocyte cryopreservation[J]. Reprod Biomed Online, 2004, 9(2): 152-163.
- [33] Gosden R G. Prospects for oocyte banking and *in vitro* maturation[J]. J Natl Cancer Inst Monographs, 2005, 34: 60-63.

Research progress of human oocytes maturation *in vitro*

WANG Hong-feng¹, SHI Juan-zhi², LIU Jin-ping², ZHOU Han-yang², DOU Zhong-yang¹

(1 Shaanxi Branch of National Stem Cells Engineering & Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Maternal and Child Care Hospital of Shaanxi Province, Xi'an, Shaanxi 710003, China)

Abstract: *In vitro* maturation of human oocytes is the foundation for assisted reproduction technology. Improving the maturation rate of oocytes will provide more quality embryos for patients. The factors which affect the maturation rate include patients' age, length of time for IVF, and solution for IVF. This review highlights the mechanisms that at present are known to be involved in the oocytes maturation and factors for IVF, and the significance of IVF clinical application is anticipated.

Key words: human; *in vitro* maturation of oocytes; mechanisms of oocyte maturation; affecting factor; significance of clinical application

(上接第 31 页)

Abstract ID: 1671-9387(2006)07-0027-EA

Effect of soybean protein hydrolysate on digestive tract development of early weaned 21-day-old piglet

PAN Cui-ling, CHEN Wei-hua, ZOU Si-xiang, YANG Xiao-jun

(Key Laboratory of Animal Physiology and Biochemistry, Ministry of Agriculture, Animal Medicine College,

Nanjing Agriculture University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: An experiment was done to investigate the effect of soybean protein hydrolysate on digestive tract development of 21-day-old weaned piglets by making 28-day-old weaned piglets as the control. The results showed that, compared with the control, pepsin total activity of gastric chyme of piglet in the treatment increased by 3.22%, but the difference was not significant ($P > 0.05$), protease total activity of duodenal chyme remarkably increased by 136.05% ($P < 0.01$), whereas lipase activity and amylase activity of duodenal chyme decreased ($P < 0.01$). The thickness of gastric antrum mucosa, middle duodenum villus height, crypt depth and middle ileum villus height of piglet in the treatment were all significantly higher than those of the control ($P < 0.01$), but there was no significant difference in middle duodenum villus, foreside jejunum, middle ileum villus width and villus height/crypt depth of piglet in the treatment when compared with the control.

Key words: early weaned piglet; soybean protein hydrolysate; digestive tract enzyme activity; morphology of gastrointestinal tract