

绵羊卵巢腔前卵泡的分离与体外培养

刘海军¹, 薛俊², 徐直¹, 张冬梅¹, 李义海¹

(1. 天津市畜牧兽医研究所, 天津 300112; 2. 天津市农业生物技术研究中心, 天津 300192)

摘要:分离方法和绵羊年龄对绵羊卵巢腔前卵泡的分离效果有显著影响。从每只羊获得腔前卵泡的总数看,机械分离法(89.5)和酶消化法(103.3)差异不显著,而正常卵泡数和正常卵泡率机械分离法(27.9,31.2%)明显高于酶消化法(19.1,18.5%);采用机械分离法,每只初情期前绵羊获得的腔前卵泡总数和正常卵泡数(125.6,35.1)均高于成年绵羊(60.4,16.1),而正常卵泡率(28.1%比26.8%)差异不显著。腔前卵泡在体外培养6 d,培养液中添加20 ng/mL的IGF-I,培养结束时卵母细胞直径增幅为34.8 μm ,与对照组的29.9 μm 差异不显著。

关键词:绵羊;腔前卵泡;分离;体外培养

中图分类号:S814.8;S826 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2004)02-0013-04

Isolation and *in vitro* Culture of Sheep Preantral Follicles

LIU Hai-jun¹, XUE Jun², XU Zhi¹, ZHANG Dong-mei¹, LI Yi-hai¹

(1. Tianjin Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Tianjin 300112, China;

2. Tianjin Research Center of Agricultural Biotechnology, Tianjin 300192, China)

Abstract: Isolation method and sheep age had significant effects on the isolation efficiency of sheep preantral follicles. Per sheep mechanical isolation obtained the same total preantral follicles(89.5) with that of enzyme digestion(103.3) ($P>0.05$) per sheep, but normal follicle rate(31.2%) of mechanical isolation was high than that (18.5%) of enzyme digestion ($P<0.05$). By mechanical isolation, per prepuberty sheep obtained higher total preantral follicles and normal preantral follicles(125.6,35.1) than that of adult sheep (60.4,16.1) ($P<0.05$), but normal follicle rate did not differ(28.1% vs 26.8%). Preantral follicles were cultured *in vitro* for 6 days, no difference was observed in oocyte growth(34.8 μm vs 29.9 μm) between IGF-I(20 ng/mL) treated follicles and controls.

Key words: Sheep; Preantral follicle; Isolation; *In vitro* culture

近年来,体外受精、核移植、转基因等胚胎工程技术已取得了很大进展。然而,这些技术依赖于具有完全发育能力的卵母细胞的获得,目前采用的有腔卵泡卵母细胞的体外成熟和超数排卵,不能提供充足的卵母细胞以支撑胚胎工程技术的进一步发展。卵巢中的卵母细胞绝大多数以无腔的形式存在于卵巢皮质内,有腔卵泡所占比例很少。例如,山羊卵巢有几万个不同类型的卵泡,在自然状态下,有腔卵泡仅占卵泡总数的1%~2%^[1]。因此,通过建立腔前卵泡的体外培养体系,获得大量的具有成熟

和受精能力的卵母细胞,将极大的促进体外受精等胚胎工程技术的研究与应用,并有利于研究卵泡和卵母细胞的生长和发育规律。对于珍稀濒危野生动物而言,个体的遗传贡献将对物种的保存具有极大的价值,获得腔前卵泡进行卵母细胞体外生长成熟和受精,将会最大限度地挖掘保存卵巢上遗传资源的潜力。

腔前卵泡的研究在小鼠等啮齿类动物较多,而且获得了来自腔前卵泡卵母细胞的仔鼠^[2,3]。在家畜上也进行了腔前卵泡的分离和培养的研究,但进

收稿日期:2003-09-24

基金项目:天津市青年科学基金资助项目(973404511)

作者简介:刘海军(1967-),男,蒙古族,内蒙古赤峰人,博士,副研究员,主要从事动物胚胎生物技术研究工作。

展缓慢。Hiaro 等^[4]首次将猪腔前卵泡卵母细胞体外发育成熟后授精,发现3枚被精子穿入,但未形成原核。Wuji 等^[5]在猪的腔前卵泡研究中取得了较大进展,将选择分离的猪大腔前卵泡(200~300 μm)进行体外培养,有51%的卵母细胞完成减数分裂至MII期,其中53%成熟的卵母细胞受精,43%受精卵分裂,13%发育至囊胚期,这是目前家畜腔前卵泡研究的最好结果,从畜种上看,牛、山羊、绵羊等的腔前卵泡研究进展落后于猪。Gutierrez 等^[6]研究了EGF、IGF-I、FSH等对牛腔卵泡生长的影响,并首次证明牛腔前卵泡在体外发育至腔的形成。周欢敏和张涌^[7]报道,山羊无腔卵泡卵母细胞在合适的培养体系中能在体外存活并生长,并能发育到成熟时的大小。芮荣等^[8]体外培养山羊腔前卵泡卵母细胞16d后,得到1枚排出第一极体的孤雌激活卵。关于绵羊腔前卵泡的研究甚少,Cecconi 等^[9]将绵羊腔前卵泡在体外培养达到腔的形成,卵泡液中产生了雌二醇;Newton 等^[10]报道,将绵羊的腔前卵泡在无血清的培养基中培养到有腔阶段;在国内尚未见相关研究报道。

本研究的目的在于建立绵羊腔前卵泡的有效分离方法,并初步建立绵羊腔前卵泡卵母细胞的体外培养体系。

1 材料和方法

1.1 绵羊卵巢来源

成年绵羊卵巢取自个体屠宰场,初情期前绵羊购自附近农村,屠宰后获取卵巢,放入32℃生理盐水(含200 IU/mL青霉素和200 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素)中,于2h内送至实验室。

1.2 腔前卵泡的分离

将采回的卵巢于37℃PBS中洗3遍,去掉多余组织和髓质,转移至MEM液中,用手术刀片切成小的碎片,然后按以下两种方法进行腔前卵泡的分离:机械分离法,在体视显微镜下,用带有针头的1 mL注射器机械剥离皮质部的腔前卵泡;酶消化法,用由MEM Hepes培养液配制的0.1%胶原酶消化液,在38.5℃、5%CO₂、饱和湿度下消化30 min,然后用吸管吹打约20次,离心(1 000 r/min)2~3次,洗去消化酶,再用直径450 μm 的网筛过滤。

1.3 腔前卵泡的选择

将分离到的腔前卵泡用显微镜测微尺测量卵泡直径。选择卵泡直径在250 μm 以内,大小接近,具

有完整的基膜,2~4层分布均匀的颗粒细胞,卵母细胞胞质均匀。

1.4 腔前卵泡的体外培养

腔前卵泡培养液由MEM+10 $\mu\text{g/mL}$ FSH组成,设添加或不添加20 ng/mL IGF-I两个处理。采用微滴法培养,每100 μL 微滴放5~10枚腔前卵泡,在5%CO₂、38.5℃、饱和湿度下培养6 d。每2 d换50%培养液,培养开始和结束时记录卵母细胞直径。以卵泡最外缘直径代表卵泡直径,透明带外径代表卵母细胞直径。

1.5 统计分析

用t检验进行数据处理,试验重复3次以上。

2 结果与分析

2.1 分离方法对绵羊腔前卵泡卵母细胞分离效果的影响

分别采用机械分离法和酶消化法分离绵羊卵巢腔前卵泡,比较腔前卵泡回收数和正常率,结果见表1。结果表明,虽然胶原酶消化法分离所获得腔前卵泡的数量略高一些,但与机械分离法比较差异不显著($P>0.05$);而正常卵泡数和正常卵泡率机械分离法显著高于酶消化法($P<0.05$)。因此,应认为机械分离法优于酶消化法。

表1 分离方法对绵羊腔前卵泡分离效果的影响

分离方法	卵巢数 (个)	每只羊分离 腔前卵泡数	正常卵泡数	正常卵泡率 (%)
机械分离法	8	89.5 a	27.9 b	31.2 d
酶消化法	8	103.3 a	19.1 c	18.5 e

注:同一栏内字母不同者表示差异显著($P<0.05$),下同

2.2 绵羊年龄对腔前卵泡分离效果的影响

采用机械分离法分别分离成年绵羊和初情期前绵羊卵巢腔前卵泡,两种年龄绵羊的腔前卵泡分离效果见表2。结果表明,每只初情期前绵羊平均分离的腔前卵泡数和正常腔前卵泡数均高于成年绵羊($P<0.05$),正常卵泡率二者之间差异不显著。表明绵羊年龄对腔前卵泡的分离效果有明显影响,初情期前绵羊卵巢腔前卵泡的分离效果优于成年绵羊。

表2 绵羊年龄对腔前卵泡分离卵泡效果的影响

年龄	卵巢数 (个)	每只羊平均腔前卵泡数		
		总数	正常卵泡数	正常卵泡率(%)
初情期前绵羊	14	125.6 a	35.1 c	28.1 e
成年绵羊	10	60.4 b	16.1 d	26.8 e

2.3 IGF-I 对绵羊腔前卵泡卵母细胞生长的影响

比较在基础培养液中添加 20 ng/mL IGF-I 对绵羊腔前卵泡卵母细胞生长的影响, 结果见表 3。添加与不添加 IGF-I 的卵母细胞直径增幅差异不显著($P>0.05$), 表明添加 20 ng/mL 的 IGF-I 并未促进卵母细胞的生长。

表 3 IGF-I 对绵羊腔前卵泡母细胞生长的影响

IGF-I 浓度 (ng/mL)	卵泡数	卵母细胞直径(μm)		
		培养 0 d	培养 6 d	增幅
0	58	78.2	108.1	29.9
20	73	76.8	111.6	34.8

3 讨论

3.1 关于腔前卵泡的分离

由于成年绵羊卵巢结缔组织多, 腔前卵泡不容易释放出来, 因此分离到的腔前卵泡数量少于初情期前绵羊。这与 Figueiredo 等^[11]用组织切碎机分离牛腔前卵泡的结果相似, 腔前卵泡的回收率以胎牛最高, 其次为犊牛, 成年牛最低。

本研究的结果表明, 从每只羊分离的腔前卵泡数量上看, 机械分离法和酶消化法差异不显著, 但正常卵泡的比例前者高于后者, 据此认为机械分离法优于胶原酶分离法。而在近期的报道中, Cecconi 等^[9]分离绵羊腔前卵泡以及 Gutierrez 等^[6]和 McCaffery 等^[12]分离牛腔前卵泡均采用了机械分离法。胶原酶消化法分离腔前卵泡效果不理想的原因, 可能是由于酶的作用对卵泡基膜造成了一定的损害。残留的胶原酶也可能会影响到腔前卵泡的生长。有关胶原酶影响腔前卵泡存活的问题已被 Nicosia 等^[13]所证实, 他们的电镜研究结果表明, 用胶原酶消化处理时间长于 30 min 时, 就会发现细胞受损, 卵泡脆性增加。采用机械分离法, 则避免了酶消化作用的不利影响, 而保持分离到的腔前卵泡的结构完整性。

3.2 关于培养液中添加 IGF-I

本试验中, 基础液添加了 20 ng/mL 的 IGF-I, 与对照组相比, 卵母细胞直径增长差异不显著。Gutierrez 等^[6]的研究表明, IGF-I 对牛腔前卵泡卵母细胞的生长没有影响, 对卵泡的生长率和腔的形成有促进作用。IGF 系统已在大的有腔卵泡中很好地定义, 但关于 IGFs 在卵泡发育的早期阶段的影响研究还很少。Wandji 等^[14]从未成熟小鼠的初级卵泡检测到低水平的 IGF-ImRNA, 但是在晚期腔前和早期有腔阶段转录增至最大; 另外, 退化卵泡

有低水平的 IGF-I, 这表明 IGF-I 与迅速增大的小鼠的大腔卵泡和早期有腔卵泡的生长和存活密切相关。然而在 IGF-I 产生时间和空间上的区别, 表明在啮齿动物和家畜品种之间不同的活动机制。在绵羊, IGF-I 对来自小卵泡(1~3 mm)的颗粒细胞的作用是广泛的, 而在更成熟的卵泡(5~7 mm), 类固醇生成的影响占主要地位^[15]。关于 IGF-I 的来源, 在早期的有腔阶段, 在绵羊的颗粒细胞和泡膜细胞^[16]以及猪卵泡的颗粒细胞^[17]中已检测到 mRNA, 但没有检测到腔前阶段的表达。在牛有腔卵泡的颗粒细胞^[18]和泡膜细胞^[19]中检测到低水平的 IGF-mRNA, 卵泡选择后水平增加, 表明 IGF-I 在卵泡发生的晚期阶段是重要的(即与 LH 反应有关)。本研究中培养液添加 IGF-I 对绵羊腔前卵泡卵母细胞的生长未有促进作用, 但应进一步研究在体外条件下, IGF-I 对绵羊腔前卵泡的腔的形成影响。本研究中经 6 d 的培养, 绵羊卵巢腔前卵泡卵母细胞的直径生长到 110 μm , 还未发育到成熟时的大小。由于腔前卵泡卵母细胞的生长发育受许多复杂因素的调控, 因此, 需进一步完善和改进培养系统, 以获得达到成熟时大小并具有成熟能力的卵母细胞。

4 结论

首次在国内对绵羊卵巢腔前卵泡进行了分离、培养。

建立了一套有效、适用的绵羊腔前卵泡采集方法, 结果表明: 机械分离法优于酶消化法, 初情期前绵羊的腔前卵泡回收率高于成年绵羊。

初步建立了绵羊卵巢腔前卵泡的体外培养体系, 并证明 IGF-I 对绵羊腔前卵泡卵母细胞的体外生长无明显影响。

参考文献:

- [1] Ireland J J. Control of follicular growth and development [J]. J Reprod Fert, 1987, 34(增刊): 39-54.
- [2] Eppig J J, Schroeder A C. Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation and fertilization in vitro [J]. Biol Reprod, 1989, 41: 268-276.
- [3] Eppig J J, O'Brien M J. Development *in vitro* of mouse oocytes from primordial follicles [J]. Biol Reprod, 1996, 54: 97-207.
- [4] Hiaro Y, Nagai T, Kubo M, et al. *In vitro* growth and

- maturation of pig oocytes[J]. J Reprod Fertil, 1994, 100: 333 - 339.
- [5] Wu J, Emery B R, Carrell D T, *et al.* *In vitro* growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles[J]. Biol Reprod., 2001, 64: 375 - 381.
- [6] Gutierrez C G, Ralph J H, Telfer E E, *et al.* Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture *in vitro*[J]. Biol Reprod, 2000, 62: 1322 - 1328.
- [7] 周欢敏, 张 涌. 山羊卵巢无腔卵泡卵母细胞的体外生长[J]. 中国兽医学报, 1999, 19(3): 301 - 304.
- [8] 芮 荣, 张 涌. 山羊卵巢腔前卵泡卵母细胞体外发育体外成熟的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2000, 31(6): 481 - 486.
- [9] Cecconi S, Barboni B, Coccia M, *et al.* *In vitro* development of sheep preantral follicles[J]. Biol Reprod, 1999, 60: 594 - 601.
- [10] Newton H, Picton H, Gosden R G. *In vitro* growth of oocyte-granulosa cell complexes isolated from cryopreserved ovine tissue[J]. J Reprod Fertil, 1999, 115: 141 - 150.
- [11] Figueiredo J R, Hulshof S C J, Van der Hurk R, *et al.* Development of a combined new mechanical and enzymatic method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries [J]. Theriogenology, 1993, 40: 789 - 799.
- [12] McCaffery F H, Leask R, Riley S C, *et al.* Culture of bovine preantral follicles in a serum-free system: markers for assessment of growth and development [J]. Biol Reprod, 2000, 63: 267 - 273.
- [13] Nicosia S V, Evangelista I, Batta S K. Rabbit ovarian follicles. I-Isolation technique and characterization at different stages of development[J]. Biol Reprod, 1975, 13: 423 - 447.
- [14] Wandji S A, Wood T L, Crawford J, *et al.* Expression of mouse ovarian insulin-like growth factor system components during follicular development and atresia [J]. Endocrinology, 1998, 139: 5205 - 5214.
- [15] Monniaux D, Pisselet C. Control of proliferation and differentiation in ovine granulosa cells by insulin-like growth factor-1 and follicle stimulating hormone *in vitro*[J]. Biol Reprod, 1992, 46: 109 - 119.
- [16] Leeuwenberg B R, Hurst P R, McNatty K P. Expression of IGF-I messenger-RNA in the ovine ovary[J]. J Med Endocrinol, 1995, 15: 251 - 258.
- [17] Yuan W, Lucy M C, Smith M F. Messenger ribonucleic acid for insulin-like growth factors-I and- II insulin-like growth factor-binding protein-2 gonadotropin receptors and steroidogenic enzymes in porcine follicles [J]. Biol Reprod, 1992, 55: 1045 - 1054.
- [18] Schams D, Berisha B, Kosmann M, *et al.* Possible role of growth hormone, IGFs, and IGF-binding proteins in the regulation of ovarian function in large farm animals [J]. Domest Anim Endocrinol, 1999, 17: 279 - 285.
- [19] Gutierrez C G, Armstrong D G, Campbell B K, *et al.* Insulin-like growth factors (IGF) I production and expression of IGF-I and II by bovine granulosa and theca cells *in vivo* and *in vitro*[J]. J Reprod Fertil Abstr Ser, 1996, 17: 25 (abstract 66).