

山羊卵泡卵母细胞体外成熟的研究

李 颖¹, 金世英², 张树军¹, 周欢敏¹

(1. 内蒙古农业大学 生物工程学院, 内蒙古 呼和浩特 010018; 2. 内蒙古农业大学 动物科学与医学学院, 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要: 为了建立针对山羊卵母细胞的理想体外成熟培养体系, 对山羊卵泡卵母细胞的采集方法, FSH 和 LH 对山羊卵泡卵母细胞体外成熟的作用, 及培养时间对卵母细胞体外成熟的影响进行了研究。结果表明: 采用切割法平均每枚卵巢采集到的 A、B 级卵母细胞的数量明显多于抽吸法; 采用 TCM199 添加体积分数为 10% FCS, 1~2 mg/L 17β -E₂, 10 mmol/L Hepes, 0.12 mg/mL 丙酮酸钠, 0.1 mg/mL 链霉素和 0.125 mg/mL 青霉素, 10 mg/L FSH 及 20~50 mg/L LH 的培养体系, 有利于山羊卵母细胞的体外成熟, 并放出第一极体。山羊卵母细胞体外成熟培养 20, 22, 24 h, 成熟率显著高于培养 18, 26, 30 h ($P < 0.05$)。

关键词: 山羊; 卵母细胞; 体外成熟培养

中图分类号: S827.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2006)05-0083-04

Studies on Goat Oocyte *in vitro* Maturation

LI Ying¹, JIN Shiying², ZHANG Shujun¹, ZHOU Huanmin¹

(1. College of Bioengineering Inner Mongolia Agriculture University, Huhhot 010018, China;

2. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agriculture University, Huhhot 010018, China)

Abstract: The experiments had been carried out to develop an improved *in vitro* maturation system for goat oocytes by comparing the collecting methods of oocytes and the effects of FSH, LH and culture time on goat oocytes *in vitro* maturation. The result had showed that a greater number of useable oocyte was obtained by slicing method than by aspiration method. An addition of 10% FCS, 1-2 mg/L 17β -E₂, 10 mmol/L Hepes, 0.12 mg/mL pyruvate sodium, 0.1 mg/mL streptomycin, 0.125 mg/mL penicillin, 10 mg/L FSH, 20-50 mg/L LH in the TCM199 medium had been effective to goat oocyte maturation *in vitro*, and to the extruding of the first polar body. The rate of maturation of goat oocyte *in vitro* cultured for 20, 22, 24 hours had been remarkably higher than those cultured for 18, 26, 30 hours ($P < 0.05$).

Key words: Goat; Oocyte; *in vitro* Maturation

随着哺乳动物体外受精、细胞核移植和外源基因导入等高新技术的研究不断深入, 人们对成熟卵母细胞以及动物胚胎的需求量不断增加, 仅靠超数排卵技术已不能满足这类科研的需要。因此, 通过卵巢卵母细胞体外成熟获取大量的成熟卵母细胞, 而后利用体外受精技术获得的胚胎就愈来愈引起人们的重视。牛卵巢卵母细胞体外成熟已有许多研究报道^[1], 并通过体外受精提供商业性的胚胎。与牛相比, 山羊的体外胚胎相关技术发展较慢。1984 年

Kim^[2]首次选用 mKRP 液培养山羊卵泡卵母细胞, 成熟率为 55.5%。郝志明^[3]等体外培养奶山羊卵巢卵母细胞, 获得 56.7% 的成熟率。刘灵等^[4]选用组织培养液 199 (Tissue culture medium 199, TCM199) 和 Ham's F₁₂ 培养山羊卵巢卵母细胞, 体外成熟率为 79.4% 和 76.3%。张勇等^[5]采用 TCM199 培养基探索了不同浓度的胎牛血清 (Fetal calf serum, FCS)、促卵泡素 (Follicle stimulating hormone, FSH)、促黄体素 (Luteinizing hormone, LH)、 17β 雌二醇 (Oestradiol

收稿日期: 2006-03-27

基金项目: 教育部骨干教师资助计划项目(2000); 内蒙古自然科学基金(20010904-02)

作者简介: 李 颖(1971-), 女, 山西祁县人, 副教授, 在读博士, 主要从事动物胚胎工程及分子生物学研究。

17 β , 17 β -E₂) 的组合, 获得了 92.5% 的体外成熟率。到目前为止, 各实验室所得到的体外培养成熟率差异较大, 尚无一致的、保证高成熟率、高受精率的成熟培养体系。本试验对山羊卵母细胞采集方法、FSH、LH 及培养时间对山羊卵母细胞体外成熟的影响进行了研究, 旨在建立针对内蒙古绒山羊卵母细胞的理想体外成熟培养体系, 为获得更多成熟卵母细胞作为细胞核移植的受体或进行体外受精获得原核胚为转基因动物奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 卵巢的采集 卵巢采集于呼和浩特市清真大型屠宰场。绒山羊被屠宰后, 剖腹取出双侧卵巢, 立即装入盛有 25~37℃ 灭菌生理盐水或磷酸缓冲液(PBS) 的保温瓶中, 在 4 h 内送至实验室进行试验。

1.1.2 试剂 TCM199 购自 GIBCO 公司; FSH, LH 和 17 β -E₂ 购自宁波第二激素厂; FCS 购自北京 TBD 生物制品公司; 缓冲剂 Hepes 购自 SIGMA 公司; 透明质酸酶、丙酮酸钠、矿物油购自 SIGMA 公司; 青霉素、链霉素购自华北制药股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 卵母细胞的采集 在无菌条件下, 将卵巢用灭菌生理盐水冲洗 3~5 次, 盛于大烧杯中, 33℃ 水浴保温待用。卵母细胞的采集方法有 2 种: ①抽吸法。用带有 12 号针头的 5 mL 或 10 mL 注射器, 先吸少量 PBS 溶液, 然后抽吸卵巢表面 2~6 mm 卵泡, 抽吸液注入灭菌的培养皿(Φ =50 mm) 中。②切割法。将卵巢置于盛有少量 PBS 的灭菌培养皿中, 用双面刀片切割卵巢表面 2~6 mm 的卵泡, 使卵泡液收集于培养皿中; 盛有卵泡液的培养皿于 37℃ 保温板上放置 10 min, 去除上清液, 实体显微镜下检卵。根据包被卵母细胞的卵丘细胞的完整性以及卵母细胞的胞质均匀性将卵母细胞分为 3 级: A 级, 卵丘细胞完整, 卵母细胞胞质均匀; B 级, 卵丘细胞不完整, 卵母细胞胞质均匀; C 级, 卵母细胞裸露, 或胞质略有退化。A, B 级卵为体外培养可用卵。

1.2.2 卵母细胞体外培养 将 A, B 级卵丘卵母细胞复合体(COCS) 在培养液中洗涤 3 遍, 移入 CO₂ 培养箱中预平衡 2 h 后的 50 μ L 成熟培养液微滴, 在直径为 30 mm 的玻璃培养皿中, 用体外成熟培养液制成 3~4 个微滴并覆盖矿物油, 每个微滴中放入 10

~20 枚 COCS。培养条件为: 5% CO₂, 饱和湿度, 38.5℃。以排出第一极体作为卵母细胞成熟的标志。

基础培养液为: TCM199+10% FCS+1~2 mg/L 17 β -E₂+10 mmol/L Hepes+0.12 mg/mL 丙酮酸钠+双抗(0.1 mg/mL 链霉素和 0.125 mg/mL 青霉素)。

1.2.3 试验设计 分别采用抽吸法和切割法采集山羊卵泡卵母细胞, 以检查不同采卵方法对采集可用卵母细胞数量的影响。为了解 FSH 质量浓度为 10 mg/L 时, LH 浓度的改变对卵母细胞的影响, 按不同 LH 质量浓度(0, 10, 20, 30, 40, 50 mg/L) 设计一个单因素多水平试验。为了解 LH 质量浓度为 20 mg/L 时 FSH 浓度对卵母细胞的影响, 按 FSH 浓度分别为 0, 10, 20, 30, 40, 50 mg/L 设计了一个单因素多水平试验; 在基础培养液+10 mg/L FSH+20~50 mg/L LH 的培养体系下, 分别培养 18, 20, 22, 24, 26, 30 h, 比较不同培养时间对卵母细胞体外成熟率的影响。

1.3 数据处理

利用卡方检验对试验数据进行统计学处理。

2 结果与分析

2.1 采集方法对可用卵母细胞采集数量的影响

采用抽吸法每个卵巢获卵总数高于切割法, 但 A, B 级可用卵数量低于切割法, C 级卵数高于切割法, 差异均显著($P < 0.05$) (表 1)。表明卵母细胞采集方法对卵母细胞数量和质量有显著影响, 切割法对卵巢的利用率较高。

表 1 采集方法对山羊卵母细胞采集数量的影响

Tab. 1 Effects of collecting methods on the No. of collected oocytes

采卵方法 Collecting methods	卵巢总数(个) No. of ovaries	卵子数(枚) No. of oocytes		卵子总数(枚) No. of oocytes
		A, B	C	
抽吸法 Aspiration methods	76	1.8a	3.5c	5.3e
切割法 Sliding methods	82	2.9b	1.6d	4.5f

2.2 LH 对卵母细胞成熟的影响

从表 2 看出, 在 FSH 质量浓度维持 10 mg/L 不变的情况下, 不添加 LH 组与添加 LH 组之间卵母细胞成熟率差异极显著($P < 0.01$); 分别添加 20, 30, 40, 50 mg/L LH 时, 各组间无显著差异($P > 0.05$)。但添加 10 mg/L 组明显低于添加 20, 30, 50 mg/L 各组($P < 0.05$)。

表 2 LH 对山羊卵母细胞成熟的影响

Tab. 2 Effects of LH on goat oocytes in vitro maturation

LH 质量浓度 (mg/L)	培养卵子数 (个)	成熟卵子数 (个)	成熟率 (%)
Concentration of LH	No. of oocytes cultured	No. of mature oocytes	Maturation rate
0	97	0	0. 0a
10	120	84	70. 0b
20	139	117	84. 2c
30	106	87	82. 1c
40	102	84	82. 4c
50	90	74	82. 2c

注: a: b, a: c P< 0. 01; b: c P< 0. 05(表 3, 4 同)
Note: a: b, a: c P< 0. 01; b: c P< 0. 05, The same as Tab. 3, 4

2.3 FSH 对卵母细胞成熟的影响

从表 3 看出, 在 LH 质量浓度维持 20 mg/L 不变的情况下, 不添加 FSH 组与添加 FSH 组之间卵母细胞成熟率差异极显著(P< 0. 01); 添加 10, 20, 30 mg/L FSH 组与添加 40, 50 mg/L FSH 组间卵母细胞成熟率差异显著(P< 0. 05); 分别添加 10, 20, 30 mg/L FSH 时, 各组间无显著差异(P> 0. 05)。

表 3 FSH 对山羊卵母细胞成熟的影响

Tab. 3 Effects of FSH on goat oocytes in vitro maturation

FSH 质量浓度 (mg/L)	培养卵子数 (个)	成熟卵子数 (个)	成熟率 (%)
Concentration of FSH	No. of oocytes cultured	No. of mature oocytes	Maturation rate
0	70	0	0. 0a
10	89	71	79. 8b
20	76	60	78. 9b
30	80	63	78. 8b
40	67	45	67. 2c
50	73	50	68. 5c

2.4 不同培养时间对卵母细胞成熟的影响

从表 4 可以看出, 培养 18 h 的卵母细胞成熟率极显著低于培养 20, 22, 24, 26, 30 h 的卵母细胞成熟率(P< 0. 01), 且培养 26, 30 h 卵母细胞成熟率与培养 20, 22, 24 h 卵母细胞成熟率差异显著(P> 0. 05)。

表 4 培养时间对山羊卵母细胞成熟率的影响

Tab. 4 Effects of culture time on goat oocytes in vitro maturation

培养时间(h)	培养卵子数 (个)	成熟卵子数 (个)	成熟率(%)
Culture time	No. of oocytes cultured	No. of mature oocytes	Maturation rate
18	120	44	36. 7a
20	80	63	78. 8b
22	112	92	82. 1b
24	98	83	84. 7b
26	87	61	70. 1c
30	80	53	66. 3c

3 讨 论

卵母细胞的采集是进行其体外成熟的前提。本

研究中采用抽吸法, 平均每个卵巢可以获得 5. 3 枚卵母细胞, 但其中包括大量裸卵(C 级卵母细胞), A, B 级可用卵母细胞为每个卵巢 1. 8 枚; 采用切割法每个卵巢可以获得 4. 5 枚卵母细胞, 而 A, B 级可用卵母细胞为每个卵巢 2. 9 枚。比较 2 种采卵方法, 抽吸法获取卵母细胞的总数高于切割法, 但大部分是不可用卵, 采用切割法平均每个卵巢获取的可用卵母细胞的数量明显高于抽吸法(P< 0. 05)。而采用切割法和抽吸法, 卵母细胞体外成熟率没有差异^[6]。所以, 切割法对卵巢的利用率较高, 是采集山羊卵巢卵母细胞的一种简单而有效的方法。造成抽吸法可用卵母细胞数量降低的主要原因, 是由于山羊卵母细胞和卵丘细胞连接较疏松, 抽吸过程中由于吸力的作用, 易造成裸卵, 使可用卵母细胞数量减少。

促性腺激素在卵泡发育中起至关重要的作用, 它通过 cAMP 途径促进颗粒细胞增生并产生相应的 LH 受体^[7], 促使卵丘细胞膨散, 通过刺激颗粒细胞分泌成熟促进物, 直接或间接地作用于卵母细胞, 启动卵母细胞成熟分裂^[8]。Tournson 将促性腺激素加入培养基中促进人卵母细胞体外成熟, 获 81% 的成熟率^[9]。陈勇等^[10]通过添加不同剂量 FSH 于含绒毛膜促性腺激素(Human chorionic gonadotropin, HCG)的小鼠卵母细胞培养液中, 得到 FSH 通过卵丘细胞及颗粒细胞上的受体介导明显促进 COC 成熟及卵丘扩散。张涌^[5]采用 TCM199 添加体积分数为 10%~ 15% FCS, 1~ 2 mg/L 17 β -E₂, 10 mg/L FSH 及 20~ 50 mg/L LH 的培养体系, 体外培养山羊卵泡卵母细胞, 获得了 92. 5% 的成熟率。本研究发现, 在添加血清的情况下, 不添加促性腺激素无成熟卵, 而添加一定比例的促性腺激素, 尤其是 20~ 50 mg/L LH: 10 mg/L FSH 有利于山羊卵母细胞成熟, 成熟率可达 84. 2% (表 2)。这与张涌^[5]报道的结果相同。说明促性腺激素对山羊卵母细胞体外成熟有促进作用。

通常山羊大腔卵泡卵母细胞成熟时间为 20~ 24 h。刘泽隆^[11]研究指出, 山羊卵母细胞体外成熟培养 18~ 24, 15~ 25 h, 成熟率逐渐提高, 而在 30~ 35 h 时则退化程度严重。刘灵^[12]等报道, 山羊卵母细胞体外成熟培养 24 和 26 h 可获得较高的成熟率和受精率。本试验表明: 山羊卵母细胞体外培养 20 h 出现 78. 8% 的成熟率, 再经 2~ 4 h 的培养可使成熟率提高到 80% 以上; 培养 20~ 26 h, 成熟率无明

显差异,但以 22, 24 h 成熟率为最高;培养 26, 30 h 成熟率逐渐降低。与以上报道结论一致。卵母细胞成熟包括核成熟和胞质成熟。细胞核成熟后再培养 3~ 4 h 有利于卵母细胞胞质成熟^[5],成熟的时间太长或太短都不利于卵母细胞的成熟及受精。时间过短,卵母细胞不能积累足够的蛋白质和 mRNA 等,达不到完全成熟;时间过长,卵母细胞透明带老化,细胞内累积的营养物质消耗及有害成分增加。

参考文献:

- [1] 李晟阳,罗克彬,张晓华,等. 促卵泡素与促黄体素对猪卵母细胞体外成熟的影响[J]. 华北农学报, 2006, 21(1): 63- 67.
- [2] Kim C I, Imai H, Niwa K, *et al.* Maturation division of goat follicular oocytes cultured in vitro [J]. Korean J Anim Sci, 1984, 26(5): 433- 439.
- [3] Hao Z M, Qian J F, Wang J C. In vitro maturation of follicular oocytes from the mouse and dairy goat [J]. Theriogenology, 1990, 1: 364- 367.
- [4] 刘 灵, 张 涌, 钱菊汾. 山羊卵巢卵母细胞的体外成熟[J]. 西北农业大学学报, 1992, 20(1): 107- 110.
- [5] 张 涌, 刘泽隆, 李裕强. 山羊卵泡卵母细胞体外成熟的研究[J]. 西北农业大学学报, 1999, 27(1): 14- 18.
- [6] Pawshe C H, Totey S M, Jain S K. A comparison of three methods of recovery of goat oocytes for in vitro maturation and fertilization [J]. Theriogenology, 1994, 39: 206- 209.
- [7] 侯文庆. 卵泡发育的激素调节研究进展[J]. 上海兽医畜牧通讯, 2001, 2: 6- 7.
- [8] Zhang L, Jing S W, Ozniak P J, *et al.* Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization and embryo development in vitro [J]. Mol Reprod Dev, 1995, 40: 338- 341.
- [9] 谢常青, 林 戈, 杨苏安, 等. 人类不成熟卵母细胞体外成熟影响的因素初探[J]. 生殖与避孕, 2000, 20(3): 6- 7.
- [10] 陈 勇, 夏国良, 苏友强, 等. 体外培养条件下促性腺激素对昆明小白鼠卵母细胞成熟及卵丘扩展的影响[J]. 动物学报, 2001, 47(2): 203- 208.
- [11] 刘泽隆. 牛和山羊卵泡卵母细胞体外受精及其体外受精胚早期发育的研究[D]. 杨陵: 西北农林科技大学硕士学位论文, 1997.
- [12] 刘 灵, 钱菊芬, 张 涌. 山羊卵巢卵母细胞的体外受精[J]. 国外畜学—草食家畜, 1992, (增刊): 93- 96.