

# 激素对牛卵母细胞体外成熟的影响

马 红

(黑龙江省农业科学院 畜牧研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

**摘要:**研究了促卵泡素(FSH)、促黄体素(LH)和 $17\beta$ 雌二醇( $17\beta$ -E<sub>2</sub>)分别使用时对牛卵母细胞体外成熟的作用。结果表明,这三种激素单独使用时,都具有促进牛卵母细胞体外成熟的能力。在低浓度范围内,随着激素浓度的上升成熟率也上升,FSH和LH在50  $\mu$ g/mL, $17\beta$ -E<sub>2</sub>在20  $\mu$ g/mL浓度时达到最好成熟效果。

**关键词:**牛; 卵母细胞; 体外成熟; 激素

中图分类号: S821; Q813 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2009)增刊-0338-02

## The Influence of Hormone on *in vitro* Maturation of Bovine Oocytes

MA Hong

(Heilongjiang Academy of Agriculture Sciences, Harbin 150086, China)

**Abstract:** The objective of this study was to determine the effect of follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH) and  $17\beta$  estradiol ( $17\beta$ -E<sub>2</sub>) respectively during bovine oocyte *in vitro* maturation (IVM). The results suggest: FSH, LH and  $17\beta$ -E<sub>2</sub> have been shown to have a positive effect during IVM. The percentage of MII-stage oocytes was significantly increased in low concentration. FSH and LH with 50  $\mu$ g/mL,  $17\beta$ -E<sub>2</sub> with 20  $\mu$ g/mL has the best influence in promoting oocyte maturation *in vitro*.

**Key words:** Bovine; Oocytes; *in vitro* maturation; Hormone

随着动物克隆技术和胚胎工程技术的发展,对体外生产胚胎的质量和数量要求越来越高,而提高卵母细胞成熟率和成熟质量,则显得尤为重要。许多试验表明体外受精胚胎前期的代谢活动主要是由母源性基因及其产物所调控。因此卵母细胞体外成熟情况是决定卵裂率及其囊胚发育率高低的关键<sup>[1]</sup>。在体内,FSH和E<sub>2</sub>能促进优势卵泡内颗粒细胞增殖,增加内膜细胞表面LH受体,并促发LH在排卵前出现高峰,这些因素共同作用,使卵母细胞减数分裂恢复并导致卵母细胞成熟和排卵<sup>[2]</sup>。

目前,大多数的卵母细胞在进行体外成熟培养时,其培养液中都添加有FSH或LH或两者的混合物,并已初步证明,这些激素能促进卵母细胞的体外成熟<sup>[3]</sup>。但激素使用浓度在不同哺乳动物卵母细胞体外成熟时却有很大差异,即使同一种动物,如牛,所添加剂量的报道也不尽相同<sup>[4-7]</sup>。这与各个不同研究者的环境条件、培养体系和激素来源有着直接的关系。

在本研究中,在体外成熟液中分别添加不同浓度的FSH、LH及E<sub>2</sub>对牛卵母细胞进行体外培养,以确定在本研究体系下,它们分别单独使用时对卵母细胞成熟的影响,得出在本研究条件下,适合牛卵母细胞体外成熟的最佳剂量。

## 1 材料和方法

### 1.1 卵巢卵母细胞的采集

将采集的卵巢置于30℃含硫酸庆大霉素的灭菌生理盐水的保温瓶,3 d内运回实验室。用预温的生理盐水清洗卵巢,用10 mL注射器吸取卵巢表面2~5 mm大小的卵泡,卵泡液收集于60 mm培养皿中,待用。

### 1.2 卵丘-卵母细胞复合体的体外成熟培养

1.2.1 成熟液的配置 以TCM-199+10% FBS成熟培养作为基础培养液和对照组。在基础培养液中分别添加不同浓度的促卵泡素(FSH)、促黄体素(LH)、和 $17\beta$ 雌二醇( $17\beta$ -E<sub>2</sub>),每种激素均设10, 25, 50, 75, 100  $\mu$ g/mL五种浓度梯度分别进行成熟培养。以上各组试验结果均重复3次以上。

1.2.2 收集可用于成熟培养的卵丘-卵母细胞复合体(Cumulus oocyte complexes, COCs) 将收集的COCs分别用各种不同的成熟液清洗3遍,然后置于含成熟培养液的35 mm培养皿中,在38.5℃、5% CO<sub>2</sub>和饱和湿度的CO<sub>2</sub>培养箱中培养。

### 1.3 成熟卵的检查

将成熟培养后22 h的COCs置于含0.2%透明

质酸酶和 5% FBS 的 H- M199 中, 用 100  $\mu$ L 的微量移液器反复吹吸, 去掉成熟卵母细胞表面的卵丘细胞, 用含 5% FBS 的 H- M199 洗涤 3 次, 以排出第一极体为成熟标准, 于显微镜下检查成熟率。

## 2 结果与分析

### 2.1 FSH 浓度对牛卵母细胞体外成熟的影响

由表 1 可以看出, 添加 FSH 各组与对照组相比, 卵母细胞的成熟率均显著提高, 差异显著。而添加 10, 25, 100  $\mu$ g/mL 组卵母细胞的成熟率之间差异不显著。50  $\mu$ g/mL 组卵母细胞的成熟率最高, 与其他各组相比差异显著, 且卵丘细胞扩散好。

表 1 不同 FSH 浓度对牛卵母细胞体外成熟的影响  
Tab. 1 Effect of FSH on bovine oocytes *in vitro* maturation

处理 Treatment	总卵母细胞数/枚 Oocytes	成熟卵母细胞数/枚 Maturation oocytes	成熟率/% Maturation rate
对照 Control	150	53	35.3 a
10 $\mu$ g/mL	203	149	73.4 b
25 $\mu$ g/mL	210	166	79.0 b
50 $\mu$ g/mL	196	161	82.1 c
100 $\mu$ g/mL	205	159	77.6 b

注: 上标 a, b, c 值表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。下同。  
Note: a, b, c values with difference superscript were significantly different within column ( $P < 0.05$ ). The same belowed.

### 2.2 LH 浓度对牛卵母细胞体外成熟的影响

由表 2 可以看出, 添加 LH 各组与对照组相比, 卵母细胞的成熟率均显著提高, 差异显著。添加 10  $\mu$ g/mL 组显著低于其他添加 LH 组。而 25, 50, 100  $\mu$ g/mL 组之间差异不显著。

表 2 不同 LH 浓度对牛卵母细胞体外成熟的影响  
Tab. 2 Effect of LH on bovine oocyte *in vitro* maturation

处理 Treatment	总卵母细胞数/枚 Oocytes	成熟卵母细胞数/枚 Maturation oocytes	成熟率/% Maturation rate
对照 Control	150	53	35.3 a
10 $\mu$ g/mL	304	187	61.5 a
25 $\mu$ g/mL	315	221	70.2 b
50 $\mu$ g/mL	298	224	75.2 b
100 $\mu$ g/mL	325	248	76.3 b

### 2.3 $17\beta$ -E<sub>2</sub> 浓度对牛卵母细胞体外成熟的影响

由表 3 可以看出, 添加  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 个组与对照组相比, 成熟率差异显著, 但添加  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 各组之间并无

表 3 不同  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 浓度对牛卵母细胞体外成熟的影响  
Tab. 3 Effect of  $17\beta$ -E<sub>2</sub> on bovine oocyte *in vitro* maturation

处理 Treatment	总卵母细胞数/枚 Oocytes	成熟卵母细胞数/枚 Maturation oocytes	成熟率/% Maturation rate
对照 Control	150	53	35.3 a
10 $\mu$ g/mL	263	161	61.2 b
20 $\mu$ g/mL	254	175	68.9 b
30 $\mu$ g/mL	286	180	62.9 b
40 $\mu$ g/mL	296	187	63.2 b
50 $\mu$ g/mL	288	182	63.2 b

显著差异。

## 3 讨论

有研究表明, 在卵母细胞体外成熟过程中, FSH 对卵母细胞体外成熟的作用主要是诱导卵丘扩散, 暂时性抑制生发泡破裂, 改变第一次成熟分裂的时间, 促进胞质的成熟<sup>[8]</sup>。本研究也发现, 在成熟液中添加 FSH 后, 卵丘颗粒细胞扩散情况好于添加其他激素, 而在 50  $\mu$ g/mL 浓度时, 卵丘细胞扩散最好, 成熟率也最高。而将 LH 加入卵母细胞的培养液中, 能有效促进卵母细胞发育及其随后的 IVF 和 IVC<sup>[9]</sup>。培养液中分别添加 FSH 和 LH 均在 50  $\mu$ g/mL 浓度时达到最好成熟效果。

E<sub>2</sub> 具有促进卵母细胞成熟分裂的恢复的功能, 是促进胞质成熟的重要成分。在本试验中, 添加 10  $\mu$ g/mL 的 E<sub>2</sub> 后, 卵母细胞成熟率明显高于对照组, 但继续加大浓度却不能进一步提高卵母细胞成熟率。

由本研究的结果表明, 这三种激素单独使用时, 都具有促进牛卵母细胞体外成熟的能力, 但作用原理、最佳浓度和最后的成熟效果不尽相同。它们促进成熟的作用在低浓度范围内, 会随着激素浓度的上升成熟率也上升, 但随着激素浓度的进一步增加, 它们促进成熟的能力达到平台期, 甚至开始下降, 因此在实际使用前, 必须确定其最佳使用浓度。

### 参考文献:

[1] 石德顺, 卢克焕. 牛卵泡液对牛卵母细胞体外成熟的影响[J]. 广西农业大学学报, 1994, 13(1): 1-5.  
[2] Keskinete L, Brackett B G. In vitro developmental competence of in vitro matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media[J]. Biol Reprod, 1996, 55(2): 333-339.  
[3] Lindeberg M, Carlström K, Ritvos O, et al. Gonadotrophin stimulation of non-luteinized granulosa cells increases steroid production and the expression of enzymes involved in estrogen and progesterone synthesis[J]. Hum Reprod, 2007, 22(2): 401-406.  
[4] Chohan K R, Hunter A G. Meiotic competence of bovine fetal oocytes following in vitro maturation[J]. Anim Reprod Sci, 2003, 76(1-2): 43-51.  
[5] Choi Y H, Carnevale E M, Seidel G E Jr, et al. Effects of gonadotropins on bovine oocytes matured in TCM-199[J]. Theriogenology, 2001, 56(4): 661-670.  
[6] Izadyar F, Zeinstia E, Colenbrander B, et al. In vitro maturation of bovine oocytes in the presence of bovine activin A does not affect the number of embryos[J]. Anim Reprod Sci, 1996, 45(1-2): 37-45.  
[7] Armstrong D T, Irvine B J, Earl C R, et al. Gonadotropin stimulation regimens for follicular aspiration and in vitro embryo production from calf oocytes[J]. Theriogenology, 1994, 42(7): 1227-1236.  
[8] Zuelke K A, Brackett B G. Effects of luteinizing hormone on glucose metabolism in cumulus-enclosed bovine oocytes matured in vitro[J]. Endocrinology, 1992, 131(6): 2690-6.  
[9] Benjamin G, Brackett J. Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos[J]. Theriogenology, 1993, 39: 43-46.