

马鹿卵母细胞体外成熟培养初步研究

崔凯¹ 李和平¹ 齐艳萍¹ 陈学进²

(1.东北林业大学野生动物资源学院 哈尔滨 150040; 2.上海第二医科大学 上海 200025)

Wapiti (*Cervus elaphus*) Oocytes In Vitro Maturation

CUI Kai¹ LI He ping¹ QI Yan ping¹ CHEN Xue-jin²

(1.College of Wildlife Resources, Northeast Forestry University Harbin 150040; 2.Shanghai Second Medical University Shanghai 200025)

摘要:以我国的马鹿为试验对象,探讨温度、成熟培养液和不同级别卵丘卵母细胞复合体(COC)对鹿卵母细胞体外成熟的影响。结果表明:38.5℃条件下马鹿卵母细胞成熟率显著高于37.0℃时($P<0.05$);试验中所设计的两组成熟培养液均可使马鹿卵子体外成熟且继续完成受精,添加胎牛血清(FBS)的比例由10%增至20%以及是否添加雌二醇(E2)对成熟培养的影响不显著($p>0.05$);马鹿COC可分为四个等级,其中A、B级COC体外培养后成熟率均高于C、D级。

关键词:鹿;卵母细胞;体外成熟;培养;

卵母细胞体外成熟(in vitro maturation, IVM)的研究不仅可以提供细胞发育机理的研究模型,更重要的是可以提供可利用的成熟卵子进行体外受精,进而产生大量的胚胎,以供胚胎移植、胚胎冷冻、核移植、嵌合、性别鉴定、胚胎分割和转基因等生物工程技术的研究和开发,从而为动物育种、濒危动物保护以及治疗人类不孕症等提供有力的手段。到目前为止,在家兔、小鼠、大鼠、牛、猪、猴、羊等动物中,已成功地获得由体外成熟的卵母细胞所产生的“试管动物”。而对于鹿卵母细胞的研究,正处于摸索和尝试中。

1 材料与amp;方法

1.1 卵巢及卵母细胞的获得

选择健康无任何疾病且年龄相近的成年母鹿(共5头,黑龙江省农垦科学院哈尔滨特产研究所种鹿场)用促卵泡素(FSH, FOLLTROPIN-V, Canada)进行超排处理,剖腹取卵巢,迅速置于盛有35~37℃灭菌生理盐水(含抗生素)的离心管中,再将离心管于保温瓶中保存,1小时内运回实验室。

用灭菌的生理盐水冲洗卵巢3~5次至无血渍为止,再用灭菌的软纸擦干卵巢表面,采用先抽吸再切割的方法采集卵泡卵母细胞。

1.2 卵母细胞的分级

检取到的卵母细胞洗涤2~3遍后从形态学上进行分级,计数后于同一培养皿中的不同培养滴中培养,以比较不同级别COC的体外成熟率。分级标准:A级为卵丘细胞致密,不扩散,细胞质均匀,形状规则,至少完全包裹有4层卵丘细胞;B级为卵丘细胞1~3层,基本上包裹卵母细胞;C级为半裸卵,卵母细胞外有部分卵丘细胞存在;D级为裸卵、变形卵,包括退化的卵母细胞。

1.3 卵母细胞的成熟培养

在显微镜下(400×)将不同级别的卵母细胞先用含 FBS (HyClone) 的洗卵液洗 2~3 次,再用成熟培养液洗 2~3 次,然后置于已平衡预热的成熟培养滴(50 微升)中培养(10 枚/滴),培养条件为 38.5℃/37.0℃, 5%CO₂, 饱和湿度。

1.4 卵母细胞体外成熟的判断

成熟培养 15~24 小时后于显微镜下观察:卵母细胞有第一极体释放,保持卵丘细胞间分泌粘稠的基质,细胞层显著膨大,细胞以卵子为中心,大体呈放射状向四周扩散者判定为已成熟,记录成熟的卵母细胞数。按徐继初(1992)主编的《生物统计及实验设计》中所介绍的方法,用相对数中率的差异显著性检验,分析不同处理后卵母细胞成熟率的差异。

1.5 成熟卵母细胞的体外受精

所有成熟培养后的卵母细胞用含 6 毫克/毫升 BSA 的 BO 液洗涤 3 次,移入 50 微升覆盖石蜡油的 BO 受精滴中(含 6 毫克/毫升 BSA 和 10 微克/毫升肝素),每滴 10 枚卵子,然后用上浮法处理马鹿精液。马鹿细管冻精于 37℃温水中解冻后置于离心管底部,加盖 3 毫升左右 BO 洗精液(含 6 毫克/毫升 BSA 和 10 毫摩尔/升咖啡因),45° 于培养箱中上浮,38.5℃, 5%CO₂, 饱和湿度。40~60 分钟取上浮液离心洗涤 2 次(2000~2200 转, 5~10 分钟),弃上清,将最后一次离心的沉淀用 BO 受精液悬浮使精子获能,并调整精子浓度为 2×10⁶ 个/毫升。精子获能后取 50 微升 1 加入受精滴中,精卵共培养,进行体外受精。

1.6 受精卵的体外培养

马鹿精子与卵子作用 14~24 小时后,将有第二极体排出的受精卵移至早期胚胎培养液 M199 中培养,每 24 小时更换 1/3 培养液,同时观察卵裂情况并计数。

1.7 试验设计

试验一:比较温度对马鹿卵母细胞体外成熟的影响,进而筛选出适宜的培养温度。

试验二:对比两种不同成分成熟培养液对马鹿卵母细胞体外成熟的影响。

成熟液 I: M199(粉剂, GIBCO) + 10%FBS + 10 毫摩尔/升 Hepes (SIGMA) + 0.2 毫摩尔/升丙酮酸钠(SIGMA) + 1 毫摩尔/升双抗(HyClone) + 10 微克/毫升 GnRH(SIGMA) + 1 微克/毫升 E₂ (SIGMA)

成熟液 II: M199 + 20%FBS + 0.2 毫摩尔/升丙酮酸钠 + 1 毫摩尔/升双抗 + 10 微克/毫升 GnRH

2 结果

2.1 不同培养温度对鹿卵母细胞体外成熟的影响

两组温度下,马鹿卵母细胞均可发育成熟并受精,但 38.5℃下的体外成熟率显著高于 37.0℃时(P<0.05)。结果详见表 1。其中未成熟卵母细胞只包括 A、B 级 COC, C、D 级未计在内。

2.2 不同成熟培养液对马鹿卵母细胞体外成熟的影响

两组成熟培养液均可在 38.5℃下使马鹿卵母细胞于体外发育成熟且受精,添加 FBS 的比例由 10%增至 20%以及是否添加 E₂ 对成熟培养的影响不显著(p>0.05)。结果详见表 1。其中未成熟卵母细胞只包括 A、B 级 COC, C、D 级未计在内。

2.3 不同级别 COC 的体外成熟培养

不同培养条件下, A 与 B 级 COC 的体外成熟率差异均不显著(p>0.05),与 C 和 D 级的成熟率相比,虽然差异显著性检验的结果并不统一,但所统计的结果中 A 与 B 级 COC 体外成熟率均高于 C 和 D 级。C 级 COC 中只有个别发育成熟; D 级 COC 在各种培养条件下均未发育成熟。结果详见表 2。不同级别 COC 成熟前后形态详见图 1。

表 1 马鹿卵母细胞体外成熟培养结果

TABLE 1 Wapiti oocyte in vitro maturation results

培养温度 culture temperature	培养液 medium	卵母细胞数 (枚) Oocyte (n)	成熟率 Maturation (%)	受精率 Fertilization (%)
37.0℃	成熟液 I	18	44.4 (8/18) ^a	25.0 (2/8)
38.5℃	成熟液 I	34	76.5 (26/34) ^b	65.4 (17/26)
38.5℃	成熟液 II	25	84.0 (21/25) ^b	71.4 (15/21)

注: 含有不同字母上标表示差异显著 (P<0.05), 含有相同字母表示差异不显著 (P>0.05)。

表 2 不同级别马鹿卵丘卵母细胞体外培养结果

TABLE 2 Different grades of wapiti cumulus-oocyte complexes in vitro maturation results

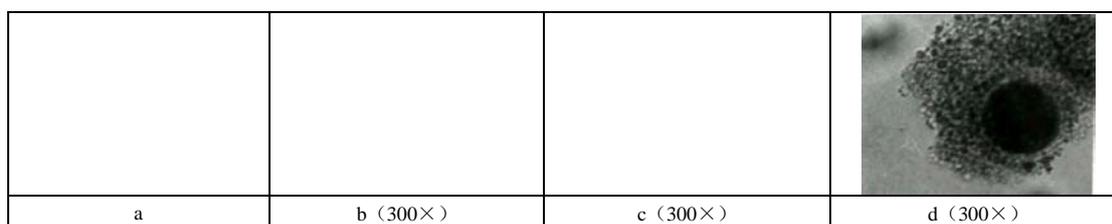
培养条件 Culture condition	卵母细胞数 (枚) Oocyte (n)	成熟率 Maturation (%)
37.0℃ 成熟液 I	A 级	10 50.0 (5/10)
	B 级	8 37.5 (3/8)
	C 级	4 0 (0/4)
	D 级	4 0 (0/4)
38.5℃ 成熟液 I	A 级	18 88.9 (16/18)
	B 级	16 62.5 (10/16) bc
	C 级	7 28.6 (2/7) b
	D 级	5 0 (0/5) c
38.5℃ 成熟液 II	A 级	20 60.0 (12/20) a
	B 级	14 71.4 (10/14) bc
	C 级	11 18.2 (2/11) b
	D 级	18 0 (0/18) ac

注: 同一列中上标含有相同字母 b 的两组间差异显著 (P<0.05), 上标字母有 a、c 的两组间差异极显著 (P<0.01), 其他无显著差异 (P>0.05)

3 分析与讨论

3.1 培养温度

不同的培养温度对体外成熟的影响很大, 有时甚至是体外成熟是否成功的关键。对于温度的选择, 众研究者的结论并不一致。有学者认为稍高一点的温度对细胞就有害, 而稍低于体温的温度对体外成熟似乎无甚影响; Katska 和 Smorag (1985) 提出减数分裂对培养温度的耐受性较高, 只有在低于体温 5℃以上才会表现出成熟率的明显下降。Eng 等 (1986) 用猪做实验发现 39℃时猪卵母细胞的体外成熟率为 71%, 而 37℃时为 35%。严云勤 (1995) 提出, 培养的温度应与相应动物的正常体温相一致。母马鹿的正常体温在 38.0~38.8℃, 平均为 38.5℃。本试验中正是采用了此温度与普通的细胞培养温度 37℃进行了比较, 虽然 37℃下马鹿卵子可以发育成熟和受精, 但成熟率和受精率均较低, 所以后续试验采用了 38.5℃。在国外对赤鹿进行卵母细胞体外成熟培养中, 学者们采用了不同的温度 38℃、38.5℃和 39℃, 均获得了成熟的卵子, 但对温度的影响作用却未进行比较, 因此尚不能确定这三种接近鹿体温的温度那种更适宜进行培养。



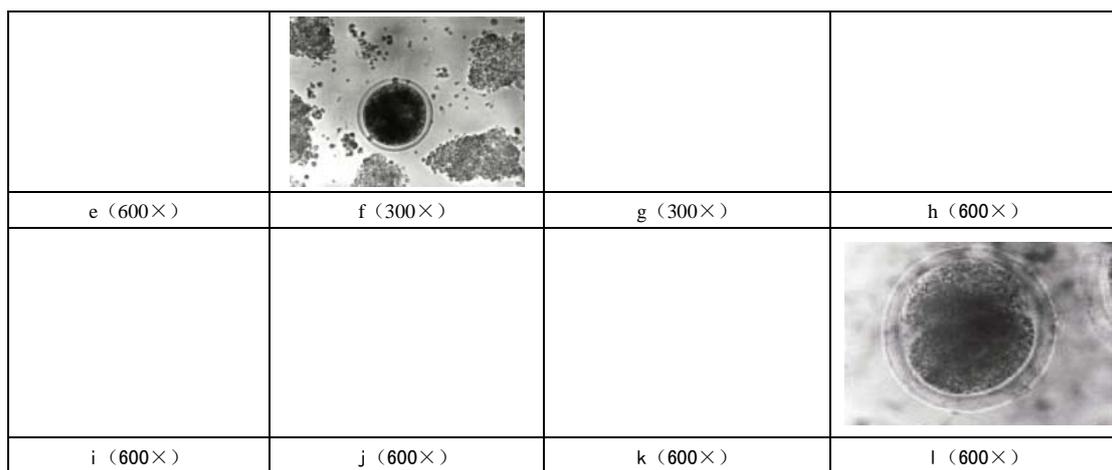


图 1 不同级别马鹿 COCs、成熟卵及受精卵形态; Fig.1 Different form of wapiti COCs, matured and fertilized oocytes: (a) 马鹿卵巢; Wapiti ovaries;(b)A 级 COC; A grade; (c) (d) B 级 COC; B grade; (e) C 级 COC; C grade; (f) 裸卵 (D 级); Naked egg (D grade); (g) D 级 COC; D grade; (h) (i) 成熟卵 (第一极体); Matured oocyte with first polar body; (j) 精卵结合; Binding; (k) 受精卵 (第二极体); Fertilized oocyte with second polar body; (l) 2-细胞; 2-cell.

3.2 培养液

本试验探索的是以 M199 为基础液, 添加不同浓度的血清和激素, 通过成熟率的比较筛选出适宜鹿卵母细胞的体外成熟培养液。培养液成分和添加比例的设计是在总结和借鉴当前众学者的研究结论的基础上进行的。M199 是目前应用较多的培养基, 特别是加入 10%FBS 或 OCS 效果更好。在血清的使用上, 以应用 FBS 的报道最多, 添加量一般为 10~20%。但也有学者指出, 在不含血清的 M199 中的卵母细胞经过体外培养也可以成熟并获得受精及胚胎发育能力。

激素在体内对卵母细胞成熟和排出的重要性已经基本为众多学者所证实。在基础培养基中添加促性腺激素 (FSH、LH) 也能提高卵母细胞的成熟率、受精率及发育率。含 10%FBS 的 TCM199 中添加 FSH、LH 和 E₂ 可使赤鹿卵子体外发育成熟并受精继续发育至胚胎。GnRH 可发挥着相当于 FSH 与 LH 的共同作用, 所以在马鹿卵子体外成熟培养液中选用 GnRH 代替 FSH 和 LH。对 E₂ 的作用的研究, 不同学者的结论不同。多数学者认为 E₂ 是促进胞质成熟的重要成分, 它能促进卵母细胞成熟分裂的复始, 又能显著提高卵母细胞的受精能力及早期胚胎的发育能力。但是 Singh (1993) 却提出, 添加 FSH 对成熟有显著的促进作用, 而添加 E₂ 无明显作用。本研究的结果虽是 E₂ 对成熟培养的影响不显著, 但产生此结果的原因可能在于成熟培养液中加入了其他未知的大分子物质和激素, 进而掩盖、抑制或改变了 E₂ 的作用。

3.3 不同级别 COCs 体外成熟的比较

未成熟卵母细胞外包裹有层数不等、形态不同的卵丘细胞, 这些卵丘细胞对卵母细胞的成熟有着极大的影响, 也由此才对卵母细胞进行了分类。通常按照卵丘细胞的形态和数量进行分类, 不同学者的分类结果不尽一致。陈大元 (2000) 的分类比较细致, 共分了 6 个等级, 郭志勤 (1998) 和王建辰 (1998) 各分了 3 级和 4 级, 都将卵丘细胞层致密而完整的统归为 A 类, 再对半裸卵、裸卵及过成熟卵进一步详细分类。所以本试验在参考各学者的分类标准的基础上, 将鹿的卵丘卵母细胞按形态上的不同分为了四个等级。通过研究得出 A、B 级 COC 适宜进行体外培养, 这一结果与其他学者所提出的卵丘细胞形态与卵母细胞成熟的关系的研究结论是基本一致的, 所以本研究中所采用的分类标准适用于鹿。

参考文献

- [1]Bainbridge D R J, Catt S L, Evans G. 1999. Successful in vitro fertilization of in vivo matured oocytes

- aspirated laparoscopically from red deer hinds (*Cervus elaphus*)[J]. *Theriogenology*, 51(5): 891~898
- [2]Berg D K, Pugh P A, Thompson J G, Asher G W. 2002a. Development of in vitro embryo production systems for red deer (*Cervus elaphus*) part3. In vitro fertilisation using sheep serum as a capacitating agent and the subsequent birth of calves[J]. *Anim Reprod Sci*, 70(1-2): 85~98
- [3]Berg D K, Thompson J G, Asher G W. 2002b. Development of in vitro embryo production systems for red deer (*Cervus elaphus*) part1. Effect of epithelial oviductal monolayers and heparin on in vitro sperm motility and penetration of in vitro matured oocytes. [J] *Anim Reprod Sci*, 70(1-2): 65~76
- [4]Blondin P, Coenen K, Sirard M A. 1997. The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation[J]. *J Androl*, 18(4): 454~460
- [5]Comizzoli P, Mauget R, Mermillod P. 2001. Assessment of in vitro fertility of deer spermatozoa by heterologous IVF with zona-free bovine oocytes[J]. *Theriogenology*, 56(2):261~274
- [6]Eng L A, Kornegay E T, Huntighon J, Farrand G D. 1986. Effect of incubation temperature and bicarbonate on maturation of pig oocytes in vitro[J]. *J Reprod Fertil*, 76: 657~662
- [7]Eppig J J, Wigglesworth K, O'Brien M J. 1992. Comparison of embryonic developmental competence of mouse oocytes grown with and without serum [J]. *Mol Reprod Dev*, 32(1):33~40
- [8]Eyestone W H, First N L. 1989. Co-culture of cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium[J]. *J Reprod Fertil*, 85(2):715~720
- [9]Katska L, Smorag Z. 1985. The influence of culture temperature on the in vitro maturation of bovine oocytes[J]. *Anim Reprod Sci*, 9:205~212
- [10]Saeki K, Hoshi M, Leibfried-Rutledge M L, First N L. 1991. In vitro fertilization and development of bovine oocytes matured in serum-free medium[J]. *Biol Reprod*, 44:256~260
- [11]Singh B, Barbe G J, Armstrong D T. 1993. Factors influencing resumption of meiotic maturation and cumulus expansion of porcine oocyte-cumulus cell complexes in vitro [J]. *Mol Reprod Dev*, 36(1):113~119
- [12]廛洪武,李荣凤,刘哲,旭日干.1997.卵母细胞的不同对牛体外受精效果的影响[J].*内蒙古大学学报(自然科学版)*, 28(1):112~116
- [13]陈大元主编.2000.受精生物学[M].北京:科学出版社
- [14]程世鹏.2000.特种经济动物常用数据手册[M].沈阳:辽宁科学技术出版社,2~3
- [15]崔凯.2004.鹿卵母细胞体外成熟与体外受精的研究(硕士论文).东北林业大学,25~28
- [16]冯伯森,王秋雨,胡玉兴.2001.动物细胞工程原理与实践[M]北京:科学出版社,219~221
- [17]郭志勤.1998.家畜胚胎工程[M].北京:中国科学技术出版社,132~133
- [18]钱云,师蔚群,丁家桐.2000.哺乳动物体外受精的研究进展[J].*动物科学与动物医学*,17(1):26~28
- [19]石德顺.1994.牛体外受精技术研究的现状与展望[J].*广西科学*,5(2):37~40
- [20]王建辰等.1998.动物生殖调控[M].合肥:安徽科学技术出版社,222~223
- [21]徐继初主编. 1992.生物统计及实验设计[M].北京:农业出版社,132~139
- [22]严云勤,李光鹏,郑晓民.1995.发育生物学原理与胚胎工程[M].哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,152~