

# 牛体外发育卵母细胞成熟的评估方法研究

李晓霞, 曹平华, 禹学礼

(河南科技大学 动物科技学院, 河南 洛阳 471003)

**摘要:** 为探讨不同评估方法对牛卵母细胞体外成熟的判定效果, 以牛卵丘卵母细胞复合体(COCs)为试验材料, 采用比较卵丘扩展、形态学观察第一极体排出和固定染色观察第一极体3种方法评估牛卵母细胞成熟率的差异。结果表明, 牛卵母细胞经体外24 h成熟培养后, 卵丘扩展分级的成熟率为76.8%, 形态学观察第一极体排出率为71.2%, 固定染色观察第一极体核成熟率为77.1%, 3种判定方法评估成熟率无显著差异( $P>0.05$ )。因此, 3种方法均可用于卵母细胞的体外成熟判定。

**关键词:** 牛; 卵母细胞; 体外成熟; 卵丘扩展; 第一极体

**中图分类号:** S823.9    **文献标志码:** A    **文章编号:** 1004-3268(2013)07-0130-04

## Study on Methods for Assessment of Bovine Oocyte Maturation Cultured *in Vitro*

LI Xiao-xia, CAO Ping-hua, YU Xue-li

(College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

**Abstract:** In this study, three different methods, including the cumulus expansion, morphologic observation or staining analysis of the first polar body eduction, were evaluated for the assessment of *in vitro* bovine oocyte maturation. The result showed that the maturation rate was 76.8% by method of the cumulus expansion while the first polar body eduction rate of morphologic observation and staining analysis were 71.2% and 77.1%, respectively. No significant difference was observed among three different methods( $P>0.05$ ), indicating that all the three methods can be used to assess the maturation of bovine oocytes *in vitro*.

**Key words:** bovine; oocytes; *in vitro* maturation; cumulus expansion; the first polar body

胚胎体外生产(IVP)技术主要包括卵母细胞体外成熟(IVM)、体外受精(IVF)、受精卵的体外培养(IVC)及冷冻保存(FC)4个主要技术环节。其中, 卵母细胞体外成熟是胚胎体外生产过程中的基础环节, 可为其他相关基础理论研究提供大量廉价的试验材料, 是配子发生、受精机制、胚胎发育、胚胎克隆和体细胞克隆等研究的基础<sup>[1]</sup>。卵母细胞的成熟要经历几个时期, 包括生发泡破裂、染色质凝集、染色体成对排列、染色体由纺锤丝牵引分离、排出第一极体(the first polar body, PB1)后停滞在M II

期<sup>[2]</sup>。卵母细胞核成熟(其特征是生发泡破裂、PB1排出)的同时, 卵丘细胞会发生扩展。卵丘扩展程度对卵母细胞成熟及其体外受精和胚胎发育有非常重要的影响<sup>[3]</sup>。但有学者认为, 卵丘扩展并不能完全代表卵母细胞成熟<sup>[4]</sup>。卵丘扩展依赖于卵母细胞, 但卵母细胞成熟不一定依赖于卵丘扩展, 卵丘扩展和卵母细胞成熟之间的关系十分复杂。而观察PB1排出情况是目前较为常用的评估核成熟的方法。传统的形态学直接观察PB1排出法, 会因PB1尚未排出存在偏差。但固定染色观察PB1法能准确地检测核相的

收稿日期: 2013-03-21

基金项目: 河南科技大学博士科研启动基金项目(09001551); 国家自然科学基金项目(31201801, 31172207)

作者简介: 李晓霞(1979-), 女, 河南西平人, 讲师, 博士, 主要从事哺乳动物的胚胎工程与性别控制研究。

E-mail: xxcp@yaho. cn

变化,可避免由于 PB1 尚未排出造成的偏差。

因此,本研究采用卵丘扩展、直接形态学观察 PB1 排出和固定染色观察 PB1 3 种方法评估牛卵母细胞经 24 h 体外成熟培养后的成熟率,探讨不同评估方法对牛卵母细胞体外成熟的判定效果,以期为实验室判定牛卵母细胞体外是否成熟提供快速、准确的方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂药品

TCM199(GIBCO 公司),促卵泡素 FSH、促黄体素 LH(中国科学院动物研究所),地衣红 Orcein(Sigma 公司),牛卵泡液 BFF(自制),其他试剂除特别注明外均购自 Sigma 公司。

### 1.2 牛卵母细胞收集

从洛阳屠宰场收集牛卵巢,置于含有双抗的生理盐水中,温度保持在 30~35℃,并于 6 h 内送回实验室。用剪刀剪去卵巢周边的多余组织,30~35℃含有双抗的生理盐水洗涤 3 次备用。用带有 12 号针头的 10 mL 一次性注射器抽吸卵巢表面直径为 2~8 mm 卵泡内的卵母细胞,用体视镜捡出卵母细胞,除去裸卵、蜘蛛网状卵和透明带变形卵。

### 1.3 卵母细胞体外成熟培养

挑选卵母细胞[包裹 2 层以上的牛卵丘卵母细胞复合体(COCs)],经洗卵液清洗 3 次后,再用成熟培养液清洗 2~3 遍,放入预先平衡过的成熟培养皿,置于 39℃、5% CO<sub>2</sub>、最大饱和湿度的培养箱中,在 50 μL 盖石蜡油的微滴中进行静置培养。基础培养液为添加 50~100 IU/mL 青链霉素的 TCM199。

### 1.4 牛卵母细胞核成熟的评估方法

1.4.1 卵丘扩展分级法 成熟培养 24 h 后取出牛卵母细胞,卵丘扩展的分级参照 Hunter 等<sup>[5]</sup>的方法进行。1 级为卵丘细胞完全扩展,卵丘细胞团至少向外扩展 3 倍于裸卵直径(300 μm);2 级为卵丘细胞中等扩展,卵丘细胞向外扩展约 2 倍裸卵直径(200 μm);3 级为卵丘细胞轻度扩展,卵丘细胞仍紧紧地粘贴在透明带上。绝大多数的 1 级卵和多数 2 级卵均已达到成熟状态排出 PB1,视为成熟卵母细胞。成熟率 = 成熟卵母细胞数/卵母细胞总数 × 100%。

1.4.2 形态学观察 PB1 排放法 成熟培养 24 h 后取出牛卵母细胞,用 0.1% 的透明质酸酶去掉卵丘细胞,在体视显微镜下观察是否排出 PB1,排出 PB1 的则为核成熟的卵母细胞。计算成熟率。

1.4.3 固定染色观察 PB1 法 成熟培养 24 h 后取出牛卵母细胞,用 0.1% 的透明质酸酶去掉卵丘细胞,经固定液(醋酸:乙醇 = 1:3)于室温(20~25℃)固定 48 h;然后用含 1% Orcein(地衣红)的醋酸(45%)溶液染色,并在相差显微镜(400×)下评估成熟率<sup>[2]</sup>。牛卵母细胞成熟过程被分为 8 个阶段,分别是生发泡期(GV)、生发泡破裂期(GVBD)、终变期(D)、前中期(Pre-M I)、中期 I(M I)、后期 I(A I)、末期 I(T I)和中期 II(M II)。统计 M II 期的卵母细胞数(核成熟卵母细胞数),计算成熟率。

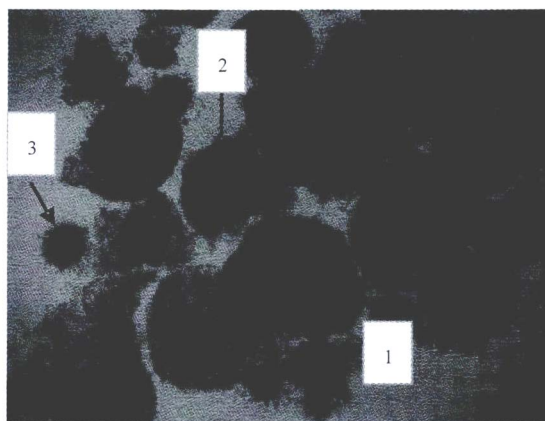
### 1.5 数据处理

所有试验重复 6 次,每个试验组至少 30 枚卵母细胞。用 SPSS 11.5 统计软件,对试验数据进行单因素方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 卵母细胞成熟后卵丘扩展结果

198 枚牛卵母细胞经 24 h 成熟培养后,1 级即卵丘细胞完全扩展为 72 枚卵母细胞,2 级即卵丘细胞中等扩展为 80 枚卵母细胞,而 3 级即卵丘细胞轻度扩展为 46 枚卵母细胞。1 级和 2 级卵母细胞共计 152 枚,因此,依据卵丘扩展情况评估牛卵母细胞的成熟率为 76.8%(图 1)。



箭头 1、2、3 分别表示 1 级、2 级、3 级卵丘扩展

图 1 体外成熟培养 24 h 牛卵母细胞的卵丘扩展情况

### 2.2 形态学观察卵母细胞成熟后 PB1 排出情况

208 枚牛卵母细胞经 24 h 成熟培养后,在体视显微镜下观察 PB1 排出情况(图 2)。共观察到 148 枚卵母细胞排出 PB1,成熟率为 71.2%。

### 2.3 固定染色观察卵母细胞成熟后 PB1 情况

210 枚牛卵母细胞经 24 h 成熟培养后,固定染色,在相差显微镜下观察 PB1(图 3),统计牛卵母细胞达到 M II 期的百分比。

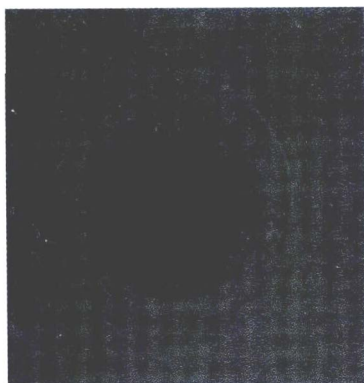


图 2 体外成熟培养 24 h 牛卵母细胞 PB1 形态



图 3 体外成熟培养 24 h 牛卵母细胞固定染色后 PB1 形态

结果表明,牛卵母细胞成熟培养 24 h 后,GV 和 GVBD 期卵母细胞数均为 0 枚,P I -M I 期卵母细胞数为 8 枚,A I -T I 期卵母细胞数为 40 枚,达到 M II 期卵母细胞为 162 枚。有研究表明<sup>[6]</sup>,M II 期卵母细胞可在其卵周隙中见到 PB1,或看到 2 团染色体存在,其中 1 团已凝集形成染色质团,将要排出 PB1,达到 M II 期的卵母细胞均可观察到 PB1 排出。由此,染色观察 PB1 排放评估牛卵母细胞的成熟率为 77.1%。

经过 24 h 体外成熟培养,上述 3 种方法评估的牛卵母细胞成熟率分别为 76.8%、71.2%、77.1%,且 3 种方法评估的牛卵母细胞成熟率无显著差异( $P>0.05$ )。说明 3 种方法均可作为牛卵母细胞体外成熟的鉴定方法。

### 3 结论与讨论

卵母细胞体外成熟是体外受精系统的关键环节,直接影响到卵母细胞成熟率和受精后早期胚胎的发育能力,包括核成熟和质成熟。目前,常用判定卵母细胞成熟的形态学方法有:卵丘扩展分级和 PB1 排出。而以 PB1 排出作为判断胞核成熟的指标,除形态学观察法外,还可通过固定染色观察极体

的排出。卵丘细胞在卵母细胞体外成熟培养过程中会发生扩展,卵丘扩展对哺乳动物卵母细胞体外成熟、受精和胚胎发育有至关重要的意义。因此,卵丘扩展程度也常作为选择用于体外受精的卵母细胞的主要标准之一<sup>[6-9]</sup>。

卵丘扩展的方法简便易行,对细胞无损伤,不影响随后的体外培养。有研究表明<sup>[6]</sup>,卵丘在扩散过程中分泌一些因子与卵母细胞核和细胞质成熟功能相关。而孙兴参等<sup>[4]</sup>研究发现,卵丘扩展良好与卵丘扩展不好的卵母细胞核成熟率无显著差异( $P>0.05$ );与其受精后的胚胎发育能力呈显著正相关,即卵丘细胞扩展越大,则卵母细胞受精后胚胎发育能力越强<sup>[10]</sup>。形态学直接观察 PB1 排出是目前公认的判断核成熟的方法,但这种方法对生发泡已破裂而极体尚未排出的卵母细胞检测存在一些偏差,且重复性不好。而固定后地衣红染色观察 PB1 法,有助于研究卵母细胞成熟中的核相变化,可用于核质成熟的同步性分析研究<sup>[11]</sup>,且可以避免由于极体尚未排出而存在的偏差。

在本试验中,牛卵母细胞经 24 h 体外成熟培养后,分别采用卵丘扩展情况、形态学观察 PB1 排出和地衣红染色观察 PB1 3 种判定成熟的方法。结果显示,卵母细胞卵丘扩展分级的成熟率为 76.8%、形态学观察 PB1 排出率为 71.2%、固定染色观察 PB1 核成熟率为 77.1%,3 种方法判定的成熟率无显著差异( $P>0.05$ )。由此说明 3 种方法均可用于评估卵母细胞的体外成熟,但地衣红染色法相较于其他 2 种方法能更准确地反映牛卵母细胞的核成熟率,且重复性好<sup>[11]</sup>。

综上所述表明,卵丘扩展分级、形态学观察 PB1 排出和固定染色观察 PB1 3 种方法均可用于卵母细胞的体外成熟判定,可根据不同试验条件选择方法。

#### 参考文献:

- [1] 李晓霞,曹平华,邓星,等.不同浓度的牛血清及牛血清白蛋白对水牛卵母细胞体外成熟的影响[J].河南农业科学,2008(7):108-110.
- [2] Berg D K, Thompson J G, Asher G W. Development of *in vitro* embryo production systems for red deer (*Cervus elaphus*). Part 2. The timing of in vitronuclear oocyte maturation[J]. Anim Reprod Sci, 2002, 70(1/2): 77-84.
- [3] Yang L S, Kadam A L, Koide S S. Identification of a cAMP-dependent protein kinase in bovine and human follicular fluids[J]. Biochem Mol Biol Int, 1993, 31(3):

521-525.

- [4] 孙兴参,岳奎忠,马所峰,等.猪卵丘扩展与卵母细胞核成熟关系的研究[J].中国农业科学,2002,35(1):85-88.
- [5] Hunter A G, Moor R M. Stage-dependent effects of inhibiting ribonucleic acids and protein synthesis on meiotic maturation of bovine oocytes *in vitro* [J]. J Dairy Sci, 1987, 70(8):1646-1651.
- [6] Chen L, Wert S E, Hendrix E M, *et al.* Hyaluronic acid synthesis and gap junction endocytosis are necessary for normal expansion of the cumulus mass[J]. Mol Reprod Dev, 1990, 26(3):236-247.
- [7] 刘海军,马群,王儒,等.来源和质量不同对山羊卵母细胞体外成熟率的影响[J].华北农学报,2012,27(2):117-120.
- [8] 刘涛,李向臣,郑伟军,等. CdCl<sub>2</sub> 对牛卵母细胞体外成熟及调亡的影响[J]. 华北农学报, 2011, 26(5):146-152.
- [9] 刘海军,侯蓉,张美佳,等.山羊卵母细胞体外成熟体外受精研究[J].天津农业科学,2011,7(3):35-38.
- [10] 钱云,师蔚群,丁家桐,等.猪体外成熟卵母细胞的卵丘扩散与胚胎发育能力的相关性[J].生殖医学杂志,2004,13(1):29-34.
- [11] 王雪红,孔振兴,董雅娟,等.卵母细胞体外成熟过程中的地衣红染色法[J].上海畜牧兽医通讯,2007(5):35.
- ~~~~~
- (上接第 129 页)
- [6] Gendelman M, Roth Z. Incorporation of coenzyme Q<sub>10</sub> into bovine oocytes improves mitochondrial features and alleviates the effects of summer thermal stress on developmental competence[J]. Biol Reprod, 2012, 87(5):118.
- [7] Aziz D M, Schnurrbusch U, Enbergs H. Effects of two homeopathic complexes on bovine sperm mitochondrial activity[J]. Homeopathy, 2012, 101(2):99-102.
- [8] 董懿为,李兴芳,封纪武,等.利用微卫星标记对4个肉牛品种进行遗传多样性分析[J].中国畜牧兽医,2010,37(8):121-129.
- [9] 李宁.动物遗传学[M].北京:中国农业出版社,2003:139-173.
- [10] 刘榜.家畜育种学[M].北京:中国农业出版社,2007:241-248.
- [11] 邹思湘.动物生物化学[M].北京:中国农业出版社,2005:41-45.
- [12] Mollet J, Giurgea I, Schlemmer D, *et al.* Prenyldiphosphate synthase, subunit1 (PDSSI) and OH-benzoate polyprenyltransferase (COQ2) mutations in ubiquinone deficiency and oxidative phosphorylation disorders[J]. J Clin Invest, 2007, 117(3):765-772.
- [13] Rotig A, Mollet J, Rio M, *et al.* Infantile and pediatric quinone deficiency diseases[J]. Mitochondrion, 2007, 7 (Suppl):112-121.
- [14] Grant J, Saldanha W J, Gould P A. A Drosophila model for primary coenzyme Q deficiency and dietary rescue in the developing nervous system [J]. DMM, 2010, 3:799-806.
- [15] 李伟静.辅酶 Q<sub>10</sub> 的生理作用及临床应用[J].生物技术通讯,2007,18(5):882-884.