

秦康乐,郭海燕,李拥军,等. 激素浓度对羔羊和成年母羊卵母细胞体外成熟培养的影响[J]. 江苏农业科学,2017,45(15):147-149.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.15.039

# 激素浓度对羔羊和成年母羊卵母细胞体外成熟培养的影响

秦康乐,郭海燕,李拥军,程国虎,张 昊

(扬州大学动物科学与技术学院/江苏省动物遗传繁育与分子设计重点实验室,江苏扬州 225009)

**摘要:**以江苏省本地白山羊羔羊为主要研究对象,经羔羊屠宰场取卵后进行体外成熟培养,在成熟培养液里添加不同浓度的促卵泡激素(FSH)和促黄体生成素(LH),探讨 FSH 和 LH 对卵母细胞成熟率的影响。并对比羔羊与母羊的后期胚胎发育能力,以探究卵母细胞成熟的调控机制。在成熟液里添加浓度为 2.5、5.0、7.5、10.0、12.5  $\mu\text{g/mL}$  的 FSH + LH,成熟培养后,其结果显示成熟液中添加不同浓度 FSH 和 LH 对卵母细胞成熟率有显著影响。其中成熟液中添加 5.0  $\mu\text{g/mL}$  FSH 和 LH 浓度的羔羊卵母细胞成熟率明显高于其他 4 组;成熟液中添加 10.0  $\mu\text{g/mL}$  FSH 和 LH 浓度的成年母羊卵母细胞成熟率明显高于其他 4 组;且羔羊和成年母羊卵母细胞在相同浓度成熟液中培养的效果无明显差异( $P>0.05$ )。

**关键词:**羔羊;卵母细胞;体外成熟;促卵泡激素(FSH);促黄体生成素(LH)

**中图分类号:** S826.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)15-0147-03

卵母细胞的成熟包括核、胞质以及尚在研究中的分子成熟。核成熟的标准是卵母细胞是否排出第一极体<sup>[1-2]</sup>;胞质成熟在卵母细胞成熟过程没有明确的标准,但研究者在试验过程中通常把颗粒细胞扩散程度、第一极体排除及卵周隙增加情况等作为评价胞质成熟的指标<sup>[3]</sup>;大量研究表明,尽管生长完全的卵母细胞能够经历正常的减数分裂和胞质成熟,但仅有小部分能够发育至囊胚阶段<sup>[4]</sup>,而且通过观测超微结构的变化难以评价卵母细胞间发育能力的差异,为此一些学者提出分子成熟的推测,即卵母细胞排卵前在母体内积累了丰富的母源 mRNA 和蛋白质,获得了接下来受精后发育

至胚胎的能力,也称“卵母细胞的获能”<sup>[5]</sup>。只有在卵母细胞核、胞质以及分子都成熟的条件下,才能进行正常的受精、受精卵分裂以及最终发育成囊胚。不过,研究者在实际试验过程中,常以卵丘细胞的扩展程度以及第一极体的排出作为卵母细胞成熟的标准<sup>[6]</sup>。

卵母细胞成熟是一个伴随着各种生理生化反应、复杂、动态的过程,在这个过程中很多因素影响其最终结果。经前人多年研究,培养液、空气成分、温度、湿度、pH 值、时间控制等因素都有了明确的参考,卵母细胞体外成熟培养体系也已经形成并成效显著,但是卵母细胞体外成熟后的发育能力仍不如体内成熟后的发育能力<sup>[7]</sup>。作为幼畜体外胚胎生产和移植技术的重要内容,卵母细胞体外成熟是体外受精和体外胚胎培养的重要基础环节,对揭示卵母细胞的成熟机理具有重要意义,为胚胎工程的研究提供了大量的试验材料。

而激素作为哺乳动物卵母细胞体内成熟的基础调节物,在卵母细胞体外成熟过程中发挥重要作用。FSH 和 LH 是卵母细胞体外成熟液中最常用的 2 种促性腺激素,此外还有雌二醇  $E_2$  和孕马血清促性腺激素 PMSG 也可在体外促进卵母

收稿日期:2016-03-28

基金项目:江苏省高校自然科学研究重大项目(编号:13KJA230001)。

作者简介:秦康乐(1992—),男,河南南阳人,硕士研究生,研究方向为动物遗传育种与繁殖。E-mail:462143066@qq.com。

通信作者:李拥军,博士,教授,研究方向为动物遗传育种与繁殖。E-mail:liy@yzu.edu.cn。

[7]朱重伟. 洛阳地区犬真菌性皮肤病流行病学调查与诊治[D]. 洛阳:河南科技大学,2012.

[8]丁明星. 北京地区犬猫被毛真菌菌群的调查[D]. 北京:中国农业大学,2003.

[9]刘拂晓. 犬猫皮肤真菌病的综合防治[J]. 特种经济动植物,2008(6):15-16.

[10]安锡忠,李俊杰,吴清波,等. 犬皮肤真菌病的临床调查及治疗研究[J]. 黑龙江畜牧兽医,2015(2):61-64.

[11]赵熠群. 上海地区犬常见皮肤病的调查与治疗研究[D]. 上海:上海交通大学,2010.

[12]李天伟. 犬皮肤真菌病和蠕形螨病的流行病学调查与临床诊疗研究[D]. 南京:南京农业大学,2006.

[13]刘会彬,余 进,李若瑜. 皮肤癣菌培养基和鉴定培养基分离鉴定皮肤癣菌的实验室和临床研究[J]. 临床皮肤科杂志,2008,37(10):654-656.

[14]吴清波. 保定市犬皮肤病的临床调查[D]. 保定:河北农业大学,2013.

[15]张 鹏,朱敬先,高顺强,等. 须毛癣菌和犬小孢子菌在体外对毛发的破坏作用[J]. 中华皮肤科杂志,2006,39(4):210-212.

[16]沈敏敏,王家俊,章强强,等. 絮状表皮癣菌和西弗念珠菌引起皮肤状况增生:一例报告[J]. 中华皮肤科杂志,2001,34(5):361-363.

[17]Norton A. A skin lesions seen in Cats with vitamin B(pyridoxine deficiency)[J]. Proc Am Acad Vet Dermatol,1987,3:24.

细胞成熟。大量研究表明,FSH 和 LH 在体外成熟培养中,协同促进成熟且在成熟液浓度相等时效果最好,但是不同研究得出的最佳浓度并不一样,这与山羊品种、季节和地域等因素息息相关。因此,本研究通过在卵母细胞成熟液中添加不同浓度 FSH 和 LH,分别研究 FSH 和 LH 对羔羊以及成年母羊卵母细胞体外成熟的影响,并对两者进行对比研究,以期完善羔羊卵母细胞体外成熟技术,提高羔羊卵母细胞的成熟效果,为后续的胚胎试验奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

胎牛血清(fetal bovine serum,FBS),购自 GIBCO 公司;透明质酸酶,购自 Solarbio 公司;FSH、LH、雌二醇(E<sub>2</sub>),购自 Bioniche 公司;HEPES、BSA (bovine serum albumin),购自 Genyiew 公司;矿物油(mineral oil),购自美国 SIGMA 公司。

成熟基础液配制:TCM199、NaHCO<sub>3</sub> 2.2 g/L,丙酮酸钠 25.0 mg/L,HEPES 4.8 g/L,青霉素钠和硫酸链霉素各 100 IU/mL。

1.2 试验方法

1.2.1 试验分组 试验分为 5 组,在成熟基础液中分别添加不同剂量的激素(表 1)。

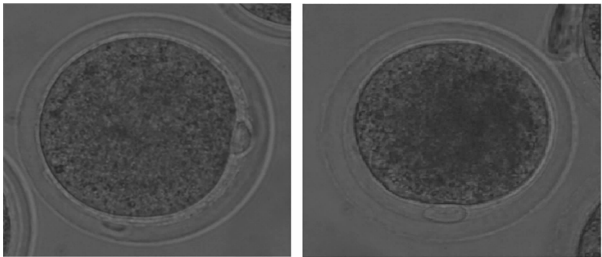
表 1 各试验组添加试剂的浓度				
试验分组	基础成熟液添加物			
	FSH (μg/mL)	LH (μg/mL)	FBS (%)	E <sub>2</sub> (μg/mL)
I 组	2.5	2.5	20	1
II 组	5.0	5.0	20	1
III 组	7.5	7.5	20	1
IV 组	10.0	10.0	20	1
V 组	12.5	12.5	20	1

1.2.2 卵巢的采集 本试验在江苏省南通市海安县山羊交易市场采集样本。选择江苏本地白山羊品种、健康的 1~2 年龄成年母羊和 2 月龄羔羊进行试验,在屠宰过程中获取其新鲜的卵巢,装入样品袋,编号后放置于冰块上,2~4 h 内运回试验室。

1.2.3 卵母细胞的收集 卵巢运回试验室后,用手术剪刀快速去除其表面多余组织,用 38.5℃ 的卵巢洗涤液清洗 3 次后放入装有 PBS 的培养皿中。把培养皿放置于 39℃ 的温控板上,挑选表面直径为 1~5 mm 的卵泡,用无菌镊子固定卵巢,用手术刀轻轻划破卵泡,再用注射器吸取 PBS 冲洗划破的卵泡,汇集冲洗液,静置 1 min 后在体视显微镜下检卵,用口吸管挑选出形态正常、胞质均匀且包有 1 层以上完整卵丘细胞的卵丘-卵母细胞复合体(COCs),随机分组进行对比试验。

1.2.4 卵母细胞成熟培养 成熟培养采用微滴培养法,微滴上覆盖石蜡油。本试验选用 35 mm 直径的培养皿,可放置 4 个微滴,每个微滴 50 μL 成熟液。把挑选好的卵丘-卵母细胞复合体用口吸管移入平衡 2 h 之后的微滴中洗涤 3 次,放置在最后 1 个微滴中。最后把各试验组培养皿移入 38.5℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度条件的培养箱中培养 24~26 h,羔羊则为 22~24 h。培养结束时可先通过观察卵丘颗粒细胞的扩散状况来初步判断卵母细胞整体成熟效果是否良好,然后把卵

丘-卵母细胞复合体放入透明质酸酶溶液微滴里,用枪头快速吹打以剥离颗粒细胞,收集卵母细胞裸卵,并在倒置显微镜下观察是否成熟,以细胞分出第一极体为成熟标准(图 1)。



A. 成年母羊成熟卵母细胞 B. 羔羊成熟卵母细胞  
图1 成熟卵母细胞

1.3 数据处理

试验数据采用 SPSS17.0 软件中单因子分析和独立样本 *t* 检验进行统计分析,并用 *LSD* 法进行差异显著性检验,*P* < 0.05 表示差异显著,*P* < 0.01 表示差异极显著。结果用“平均数 ± 标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 FSH 和 LH 对成年母羊卵母细胞体外成熟的影响

成年母羊卵母细胞体外成熟率见表 2。

表 2 不同浓度 FSH 和 LH 对成年母羊卵母细胞体外成熟的影响			
试验组	COCs 总数 (个)	总成熟数 (个)	成熟率 (%)
I 组	194	105	54.12 ± 4.42b
II 组	191	109	57.07 ± 3.57a
III 组	197	117	59.39 ± 5.21a
IV 组	188	116	61.70 ± 2.74a
V 组	192	110	57.29 ± 3.65a

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著(*P* < 0.05)。下表同。

由表 2 可知,不同浓度的 FSH 和 LH 对成年母羊卵母细胞体外成熟具有显著性的影响。成熟液中 FSH 和 LH 添加浓度为 5.0、7.5、10.0、12.5 μg/mL 时[成熟率分别为 (57.07 ± 3.57)%、(59.39 ± 5.21)%、(61.70 ± 2.74)% 和 (57.29 ± 3.65)%],其成熟率显著高于 2.5 μg/mL 组[成熟率为 (54.12 ± 4.42)%],不过这 4 组间差异不明显(*P* > 0.05),但可以看出添加浓度 10.0 μg/mL 时,其成熟率高于另外 3 组。

2.2 不同浓度 FSH 和 LH 对羔羊卵母细胞体外成熟的影响 羔羊卵母细胞体外成熟率见表 3。

表 3 不同浓度 FSH 和 LH 对羔羊卵母细胞体外成熟的影响			
试验组	COCs 总数 (个)	总成熟数 (个)	成熟率 (%)
I 组	98	56	57.14 ± 3.72a
II 组	103	63	61.16 ± 4.67a
III 组	105	62	59.05 ± 4.38a
IV 组	108	62	57.41 ± 2.71a
V 组	106	59	55.66 ± 3.36b

由表 3 可知,不同浓度的 FSH 和 LH 对羔羊卵母细胞体外成熟具有显著性的影响。成熟液中 FSH 和 LH 添加浓度为 2.5、5.0、7.5、10.0  $\mu\text{g/mL}$  时[成熟率分别为(57.14 $\pm$ 3.72)%、(61.16 $\pm$ 4.67)%、(59.05 $\pm$ 4.38)%和(57.41 $\pm$ 2.71)%],其成熟率显著高于 12.5  $\mu\text{g/mL}$  组[成熟率为(55.66 $\pm$ 3.36)%],不过这 4 组间差异不显著( $P>0.05$ ),但可以看出添加浓度 5.0  $\mu\text{g/mL}$  时,其成熟率高于其他 3 组。

### 2.3 成年母羊与羔羊卵母细胞体外成熟率的差异

由表 4 可知,成年母羊和羔羊成熟液中 FSH 和 LH 添加浓度相等时,成年母羊卵母细胞体外成熟率与羔羊无显著差异( $P>0.05$ )。

表 4 羔羊与成年母羊卵母细胞体外成熟率的差异

试验组	卵母细胞体外成熟率(%)	
	成年母羊	羔羊
I 组	54.12 $\pm$ 4.42a	57.14 $\pm$ 3.72a
II 组	57.07 $\pm$ 3.57a	61.16 $\pm$ 4.67a
III 组	59.39 $\pm$ 5.21a	59.05 $\pm$ 4.38a
IV 组	61.70 $\pm$ 2.74a	57.41 $\pm$ 2.71a
V 组	57.29 $\pm$ 3.65a	55.66 $\pm$ 3.36a

## 3 讨论与结论

### 3.1 激素对卵母细胞体外成熟效果的影响

FSH 可以诱导卵丘细胞扩散,这是卵母细胞成熟的前提条件。FSH 能促进卵丘细胞增生分化、向外扩展并刺激卵丘细胞产生一种能促进卵母细胞成熟的细胞因子<sup>[8]</sup>。FSH 还可以促进颗粒细胞分泌雌激素,间接调节卵母细胞成熟<sup>[9]</sup>。有研究表明,FSH 能维持颗粒细胞内高水平的 cAMP,从而抑制卵母细胞减数分裂即成熟,使核成熟的同时胞质也能充分成熟,提高了卵母细胞的成熟率及后期胚胎发育潜力。但有人认为,促性腺激素抑制卵母细胞的成熟,FSH 不仅抑制胞质和细胞核的成熟,而且对减数分裂纺锤体有损害<sup>[9]</sup>。由此可见,FSH 对卵母细胞成熟的具体影响还没有研究透彻。

在动物体内,FSH 可以与颗粒细胞表面的受体结合,分泌雌二醇,诱导卵泡膜上 LH 受体的生成,滤泡细胞表面 FSH 受体数目增加,随着雌二醇浓度的不断升高而分泌 LH。LH 浓度积累形成 LH 峰,使经卵丘细胞运输到卵母细胞并抑制卵母细胞成熟的物质如 cAMP 减少,激发卵母细胞第一次减数分裂的启动一直到成熟排出第一极体<sup>[10]</sup>。由此可见,在卵母细胞成熟过程中,FSH、LH、E<sub>2</sub> 等多种激素参与了调控。因此,在体外培养时,多种激素协同作用提高卵母细胞成熟率还需要继续深入研究。

### 3.2 羔羊与成年母羊卵母细胞成熟率的差异

本试验中,羔羊卵母细胞成熟率与成年母羊卵母细胞成熟率并无显著差异,这与 Ledda 等的研究<sup>[11]</sup>一致。只是此成熟率表示的是出现第一极体(核成熟)的概率,卵母细胞的胞质并不一定完全成熟,而且羔羊卵母细胞的胞质容易产生成熟不完全或紊乱,对后期胚胎发育影响巨大。由试验结果可

知,成年母羊卵母细胞在 FSH 和 LH 浓度都为 10.0  $\mu\text{g/mL}$  的成熟液中培养时,成熟率最高;而羔羊在 FSH 和 LH 浓度都为 5.0  $\mu\text{g/mL}$  的成熟液中培养时,成熟率最高。羔羊所需激素浓度与成年羊不一样,这可能是由于羔羊对激素敏感度即激素应答能力强,可以用少量的激素发挥出与成年母羊一样的成熟效果;也可能是由于幼龄动物的卵母细胞在形态、代谢和超微结构等方面与成年动物的卵母细胞有所不同<sup>[12]</sup>,羔羊对激素的代谢速度慢,更多的激素积聚在细胞质内与受体结合发挥作用。但是造成这种差别的确切机制有待进一步深入研究。

### 3.3 结论

羔羊卵母细胞成熟培养时,在成熟液中添加浓度为 5.0  $\mu\text{g/mL}$  的 FSH 和 LH,成熟率明显提高;成年母羊卵母细胞成熟培养时,在成熟液中添加浓度为 10.0  $\mu\text{g/mL}$  的 FSH 和 LH,成熟率明显提高;而且羔羊和成年母羊卵母细胞在相同成熟液中培养的效果无明显差异( $P>0.05$ )。

### 参考文献:

- [1]郭宪.牛卵母细胞体外成熟与体外受精的研究[D].兰州:甘肃农业大学,2003.
- [2]彭中友,孙俊铭,李燕,等. GDF9 和 FST 调控猪卵母细胞成熟和胚胎早期发育[J]. 江苏农业学报,2015,31(3):583-589.
- [3]Chebrou M, de Lesegno C V, Reynaud K, et al. Nuclear and cytoplasmic maturation of canine oocytes related to *in vitro* denudation [J]. Reproduction in Domestic Animals,2009,44(Suppl.2):243-246.
- [4]张志平.提高牛体外胚胎囊胚发育率的研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2003.
- [5]Hyttel P, Fair T, Callesen H, et al. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle[J]. Theriogenology,1997,47(1):23-32.
- [6]王昭晖.牛和小鼠卵母细胞体外成熟培养[D].西安:陕西师范大学,2010.
- [7]Han D, Zhao B T, Liu Y, et al. Interactive effects of low temperature and roscovitine (ROS) on meiotic resumption and developmental potential of goat oocytes [J]. Molecular Reproduction and Development,2008,75(5):838-846.
- [8]Leibf R M, Crit S E, Eyestone W H, et al. Development of bovine oocytes matured *in vitro* or *in vivo* [J]. Biology of Reproduction, 1987,36:376-383.
- [9]吕丽华,任有蛇,李富忠,等.不同激素对卵母细胞体外成熟培养的影响[J].山西农业大学学报(自然科学版),2009,29(1):8-10.
- [10]张涛,刘超,吕丽华. LH 和 hCG 对山羊卵母细胞体外成熟的影响[J]. 畜禽业,2009(4):40-42.
- [11]Ledda S, Bogliolo L, Leoni G, et al. Cell coupling and maturation - promoting factor activity in *in vitro* - matured prepubertal and adult sheep oocytes [J]. Biology of Reproduction,2001,65(1):247-252.
- [12]郭洪,万鹏程,代蓉,等.羔羊卵母细胞体外胚胎生产影响因素分析[J].湖北农业科学,2013,52(19):4726-4729.