

文章编号: 1004-0374(2013)11-1126-09

哺乳动物腔前卵泡体外培养研究进展

蒲勇^{1,2}, 张运海^{1,2}, 章孝荣^{1,2,3*}

(1 安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036; 2 安徽地方畜禽遗传资源保护与生物育种
省级实验室, 合肥 230036; 3 安徽省羊繁育工程技术研究中心, 合肥 230036)

摘要: 哺乳动物卵巢中含有数以万计的腔前卵泡 (preantral follicles), 仅不足 1% 能够发育至排卵卵泡。建立哺乳动物腔前卵泡有效分离及体外培养技术体系, 能够大量利用腔前卵泡, 增加体外成熟卵母细胞数量, 对哺乳动物胚胎体外生产、克隆及转基因动物生产等胚胎工程技术的研究与应用, 以及在体外条件下揭示哺乳动物卵泡发育机理, 都具有重要的理论意义和实用价值。鉴于卵巢质地与卵泡大小、发生周期的固有差异, 不同物种腔前卵泡分离方法与培养方式亦有所不同。同时, 培养基类型、卵泡间相互作用、促性腺激素与细胞因子等因素均会对卵泡的体外发育产生影响。系统阐述了腔前卵泡的分离方法、培养方式以及相关因素对卵泡发育的影响, 期望为从事相关研究的学者提供参考。

关键词: 腔前卵泡; 体外培养; 分离; 影响因素; 哺乳动物

中图分类号: Q813; S857.2

文献标志码: A

Advances in research on *in vitro* culture of mammal preantral follicles

PU Yong^{1,2}, ZHANG Yun-Hai^{1,2}, ZHANG Xiao-Rong^{1,2,3*}

(1 College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; 2 Anhui Provincial Laboratory for Local Livestock and Poultry Genetic Resource Conservation and Bio-Breeding, Hefei 230036, China; 3 Engineering Research Center of Reproduction and Breeding in Sheep of Anhui Province, Hefei 230036, China)

Abstract: Although mammal ovary contains a large number of preantral follicles, no more than 1% can develop into pre-ovulation follicles. There are obvious theoretical and practical values for the establishment of mammal preantral follicle isolation and culture system on embryo engineering technology and its application, such as the use of preantral follicles for oocyte *in vitro* maturation, embryo production and transgenic animal breeding, together with revealing the mechanism of follicular development. Considering ovarian texture, follicle size and folliculogenesis cycle, the isolation and culture methods for preantral follicles vary between different species. Correspondingly, culture medium, interaction of follicles, gonadotropin and cytokines also influence follicle development *in vitro*. Thus, this review systematically described the method of preantral follicle isolation and culture, together with the effect of multiple factors on preantral follicles development *in vitro*, and provided valuable information to researchers engaged in the related fields.

Key words: preantral follicles; *in vitro* culture; isolation; factors; mammals

自然条件下, 精子与卵子结合形成受精卵, 经胚胎发育最终诞生出新生个体是哺乳动物种族传递的唯一模式。在哺乳动物的一生中, 与父本终生提供足够数量的精子相比, 母本提供成熟卵子的数量是有限的。研究发现, 雌性哺乳动物卵巢皮质中含有数以万计的腔前卵泡 (preantral follicles), 终其一生只有不足 1% 能够发育至成熟卵泡并排卵。此外,

由于受到遗传、疾病、环境等众多因素的影响, 发育至排卵卵泡的卵泡数量还会进一步减少。这不仅是哺乳动物优良遗传资源的浪费, 也是以优质卵

收稿日期: 2013-06-06; 修回日期: 2013-08-15

基金项目: 十二五农村领域国家科技计划(2011AA-100307-04)

*通信作者: E-mail: zxr@ahau.edu.cn

母细胞为实验材料的体外受精、动物克隆和转基因等胚胎生物技术研究开展的主要限速步骤之一。经活检技术获取卵巢皮质块,再采用冷冻保存技术长期保存优质卵泡资源,然后在需要时通过体外培养获得健康的功能性卵母细胞,已成为当前避免浪费的主要途径。目前,卵巢皮质中腔前卵泡资源的冷冻保存技术已日趋成熟,但是,腔前卵泡体外培养体系的效率依然不理想,尤其是在大家畜上,还缺乏有效、经济、稳定的腔前卵泡体外培养体系。这极大地限制了卵巢上卵母细胞资源的大规模开发利用,归根结底是对腔前卵泡的生长发育机理认识不够。建立哺乳动物腔前卵泡体外培养体系,充分发掘新鲜/冷冻保存卵巢皮质中腔前卵泡资源,不仅能够大大丰富高质量卵母细胞的来源,有助于解决女性生育力与濒危动物种质资源的保护问题,而且对于研究特定因素对卵泡生长发育的影响及机制具有重要意义。

1 腔前卵泡体外培养研究概况

通过建立体外培养体系,大规模开发卵巢皮质中数量众多的腔前卵泡资源,获得高质量成熟卵母细胞,是增加优质卵母细胞来源最为可行的途径。在众多哺乳动物中,小鼠具备单个卵巢分离腔前卵泡数量多、腔前卵泡质量均一、无卵巢间质组织黏连以及体外培养周期短、批间差异小等优势。目前,小鼠腔前卵泡培养体系已基本建立且日益成熟。不仅能利用源于体外培养的小鼠各阶段腔前卵泡成熟卵母细胞获得后代,而且更实现了从冷冻复苏卵巢组织腔前卵泡获得后代,甚至成功获得了胎鼠原始生殖细胞来源的囊胚。1996年,Eppig和O'Brien^[1]获得了世界首例新生小鼠原始/初级卵泡来源的健康小鼠后代。2002年,dela Peña等^[2]获得了国际首例玻璃化冷冻新生小鼠腔前卵泡来源的健康小鼠后代。2007年,Kagawa等^[3]首次获得了玻璃化冷冻复苏的成年小鼠腔前卵泡来源的健康小鼠后代。2012年,Zhang等^[4]首次获得了小鼠减数分裂前原

始生殖细胞来源的囊胚。小鼠腔前卵泡研究的成功证明了哺乳动物卵巢卵泡资源经体外培养获得具备减数分裂成熟能力卵母细胞甚至后代的可行性,同时,也为其他哺乳动物腔前卵泡的研究提供了重要参考。近年来,猪、牛、羊、灵长类等物种腔前卵泡研究也取得了一些进展。2001年,Wu等^[5-6]分别首次获得了猪腔前卵泡来源的体外受精(*in vitro* fertilization, IVF)与卵胞浆内单精子显微注射技术(*intracytoplasmic sperm injection*, ICSI)囊胚。2010年,Arunakumari等^[7]首次获得了绵羊腔前卵泡来源的体外受精桑椹胚。2010年,Saraiva等^[8]首次获得了山羊早期腔前卵泡(二级卵泡)来源的体外受精桑椹胚。2011年,Xu等^[9]首次获得了非人灵长类动物腔前卵泡来源的成熟卵母细胞。

但是,大型哺乳动物腔前卵泡的研究深度还远不及小鼠。具体表现在腔前卵泡来源卵母细胞成熟率及胚胎发育率极低,且目前尚未有获得腔前卵泡来源后代的报道。鉴于卵巢卵泡生理与结构的固有差异,不同哺乳动物卵泡大小、卵泡发生周期以及卵泡的培养方式均与小鼠存在较大差异(如表1)。因此,开发合适的腔前卵泡分离与培养方法,探明各种因素对卵泡发育的影响是成功建立与完善哺乳动物腔前卵泡体外培养体系的关键。

2 腔前卵泡的分离方法

如何快速高效地分离出哺乳动物卵巢皮质内健康、完整的腔前卵泡是进行腔前卵泡研究面临的首要难题。由于不同物种间卵巢结构与质地的差异性,卵巢皮质内腔前卵泡的分离方法与困难程度也有很大的差别。机械法、酶解法和机械-酶解法是目前哺乳动物腔前卵泡分离的三种方法。

2.1 机械法

胎儿、新生儿与青春期前动物卵巢组织质地较成年动物疏松,卵巢皮质内腔前卵泡相对容易分离,此类卵巢中腔前卵泡通常采用机械法,即使用外科剪或手术刀片切开卵巢,剔除中间的髓质部,再用

表1 不同物种卵泡特征^[18]

	腔前卵泡大小(μm)	生长期(d)	成熟卵泡大小(μm)	培养方法
Mouse	100~200	10~12	500~600	贴壁、悬浮、3D
Pig	150~300	40~50	3 000~10 000	悬浮、3D
Sheep	180~250	40~50	3 000~10 000	悬浮、3D
Cow	180~250	40~50	3 800~>8 500	悬浮、3D
Human	180~250	≥90~180	17 000~20 000	悬浮、3D

眼科镊将皮质部压平,手术刀片将其切成小块后,使用分离针逐个分离皮质中的腔前卵泡。目前,机械法已成功应用于小鼠^[10]、大鼠^[11]、猪^[5-6]、牛^[12]、山羊^[13]、绵羊^[7]以及人^[14]等物种。机械法分离出的腔前卵泡结构完整性高,卵泡成活率高^[15],但是,整个操作过程需要极大的耐心与精细度,十分耗时,技术要求高,而且从每个卵巢上分离得到的腔前卵泡数量也十分有限。同时,由于早期腔前卵泡(原始卵泡和初级卵泡)直径较小,难以使用机械法逐个分离,因此,机械法适用于各物种间直径较大的二级卵泡的分离。已有研究表明,新生小鼠卵巢体积小,透明度高,腔前卵泡数量较多,且不需剔除髓质,可以在较短的时间内分离出较多的腔前卵泡,尤其适合于机械法。青幼年大型哺乳动物腔前卵泡的分离亦同样适用机械法,可以通过练习在一定程度上提高分离效率。

2.2 酶解法

酶解法是指将卵巢皮质切成皮质小块,置于消化酶(DNA酶、胶原酶、胰蛋白酶等)中进行消化处理,再辅以吹打,直接释放出卵巢皮质内的腔前卵泡。酶解法较机械法简单,能够在相同时间内分离出大量的原始卵泡和初级卵泡。但是,酶解法存在着明显的不足,即消化酶会对卵泡结构造成损伤。因此,需要根据物种的不同,精确地调整酶消化的时间,以减少消化酶对卵泡造成的伤害。Oktay等^[16]与Hovatta等^[17]采用胶原酶消化分离人卵巢组织中的卵泡,发现酶解法分离获得的卵泡膜细胞层与比邻的基膜颗粒细胞层被破坏,且在体外培养过程中,卵母细胞提前从卵泡中排出率很高。因此,酶解法主要应用于各物种卵巢内原始卵泡和初级卵泡的分离。

2.3 机械-酶解法

为克服机械法耗时费力的不足,并减少酶解法对卵泡造成的伤害,Newton等^[18]和Hornick等^[19]创新性的将卵巢皮质置于混合酶(胶原酶与DNA酶)中孵育以降解卵巢间质组织,之后辅以机械法分离出腔前卵泡,获得了良好的效果。酶解法虽然能够获得较多的腔前卵泡^[20],但许多卵泡的基膜被降解破坏,卵泡膜细胞层脱离,并最终导致后期培养过程中卵母细胞提前从卵泡中被排出。虽然可以通过缩短酶解时间来减少酶对卵泡结构的破坏,但Demeestere等^[15]发现,机械法分离的腔前卵泡培养存活率仍显著高于酶解法。虽然机械法能够获得结构完整的卵泡,但效率较低,难以在短时间内获

得大量的腔前卵泡。机械-酶解法整合了两种方法的优点,同时规避了各自的缺点,大大提高了卵巢皮质中腔前卵泡(二级卵泡)的分离效率,尤其适合于大型哺乳动物卵巢皮质内二级卵泡的分离。

3 腔前卵泡的培养方法

分离出的腔前卵泡以何种培养方式在体外培养系统中继续生长与发育是进行腔前卵泡研究面临的另一难题。根据不同物种卵巢卵泡的特点,研究人员分别开发出了普通培养法、2D培养法和3D培养法等多种腔前卵泡培养方法。

3.1 普通培养法

普通培养法是指将腔前卵泡置于培养皿皿底的培养液液滴中培养。同时,根据培养基中有无血清以及培养皿皿底结构(平底和“U”型底)的差异,普通培养法又分为贴壁培养法与悬浮培养法。贴壁培养法培养的腔前卵泡平铺于培养皿皿底(平底)生长,卵泡的三维结构被破坏,卵母细胞失去了卵泡封闭环境对外界影响的缓冲保护作用,因此,极易受到培养环境突然改变带来的影响。相应地,失去了三维结构使得卵泡细胞能够更好地接触培养基,快速完成养分与氧气的摄取以及对代谢产物的排放。同时,由于对培养体系较敏感,更便于研究人员及时发现问题并对培养体系进行调整。由于无血清培养基与“U”型底结构均不利于卵泡细胞的贴壁生长,培养于其中的卵泡会呈现出悬浮状态并维持其三维结构。因此,在无血清体系或是“U”型底培养皿中培养的方式称为悬浮培养。悬浮培养的卵泡能够维持三维结构,其封闭结构对不利环境的影响具备一定的缓冲能力。在体外培养的前几天,腔前卵泡直径的快速增长证明维持三维结构的卵泡能够更快地适应体外培养环境。作者所在实验室前期实验表明,卵巢间质细胞贴壁后的增殖能力强于卵泡细胞,导致卵泡细胞无法正常生长(未发表)。因此,贴壁培养法适合于无间质组织黏连的腔前卵泡的培养。分离出的小鼠腔前卵泡基本无间质组织黏连,因此,贴壁培养是其主要的培养方式。猪、牛、羊及灵长类哺乳动物卵巢质地与小鼠有较大差异,分离出的腔前卵泡有较多间质组织黏连,因此主要采用悬浮培养法培养。

3.2 2D培养法

2D培养法,也称铺层培养,是指将腔前卵泡置于皿底包被一定厚度的具有一定孔径的琼脂、胶原蛋白或藻酸盐的液滴中或是PC膜上,覆盖矿物

油进行培养。O'Brien等^[21]分离出小鼠二级卵泡进行2D培养,获得了支持体外受精与胚胎发育的成熟卵母细胞。Shen等^[22]将12.5 d胎鼠卵巢来源的早期腔前卵泡进行2D培养,获得了成熟的卵母细胞。2D培养法培养的卵泡能够在铺层上贴壁生长,形成一种脱离皿底的近似悬浮的贴壁生长环境。包被的皿底具有微小的孔径,增大了微滴内的氧循环量,极大地提高了卵泡的摄氧能力,同时,利于养分的摄取与代谢产物的排除,有效地促进了卵泡的生长。2D培养法较普通培养法中的贴壁培养具备明显的优势,更加有利于卵泡细胞的生长,成为小鼠腔前卵泡体外培养的主要方法。但是,此方法更多地适用于无间质组织黏连的卵泡培养,具有一定的局限性。

3.3 3D培养法

3D培养法,也称包埋培养,是指将腔前卵泡包埋于人造的琼脂、胶原或藻酸盐胶囊中后,浸没于培养液滴中培养。由于该法可给卵泡以结构性的支撑作用,较好地模拟了卵泡在体内的三维生长环境,同时具备2D培养法高氧气循环量的优点,更加有利于卵泡在体外的生长,并且能够避免黏连的间质组织贴壁生长,具有广泛的适用性,目前已成功应用于小鼠^[23]、人^[24]、猴^[9]、猪^[25]、牛^[26]、大鼠^[27]等物种,并获得了较好的培养结果。Xu等^[23]将小鼠腔前卵泡包裹于藻酸盐水凝胶中进行3D培养,获得的成熟卵母细胞经体外受精与胚胎移植获得了健康后代。Amorim等^[24]将冷冻复苏的人卵巢皮质块中的腔前卵泡于藻酸盐水凝胶中培养发现,卵泡能够正常生长,且成活率 $\geq 90\%$ 。Xu等^[9]利用3D法培养恒河猴二级卵泡40 d,首次获得了非人灵长类动物腔前卵泡来源的MII期卵母细胞。3D培养法较其他培养方法优势明显,尤其适用于各物种腔前卵泡的长期体外培养,但因其操作较为复杂,大批量操作时费时费力,且培养结束后卵母细胞的回收工作相当繁琐。因此,3D培养法较适合样本量小,需要长时间体外培养的大型哺乳动物腔前卵泡的培养。

4 腔前卵泡体外培养的影响因素

4.1 不同阶段腔前卵泡对体外发育的影响

现有研究表明,动物在出生前或是出生后的一段时间内会建立起供其一生所用的原始卵泡库。原始卵泡脱离卵泡库后,经过一系列发育最终发育至排卵卵泡并完成排卵。卵母细胞仅由单层扁平颗粒

细胞包裹是原始卵泡的主要形态学特征。脱离卵泡库的原始卵泡逐渐过渡至初级卵泡,单层颗粒细胞也由扁平状发育至柱状。随着柱状颗粒细胞的快速增殖,包裹卵母细胞的颗粒细胞层数快速增加,当颗粒细胞层数大于二层时,即发育至二级卵泡。由于原始卵泡、初级卵泡与二级卵泡的发育不依赖促性腺激素,又称为促性腺激素非依赖性卵泡。卵母细胞体积的增大及胞质内细胞器的发育是此期卵泡发生的主要事件。同时,卵母细胞分泌因子也是早期卵泡发育中卵泡膜细胞募集与颗粒细胞增殖的主要调控子。随着二级卵泡向三级卵泡的过度,卵泡膜细胞与颗粒细胞逐渐具备对促黄体素(luteinizing hormone, LH)与促卵泡素(follicle-stimulating hormone, FSH)的反应性,卵泡腔的形成说明二级卵泡已经发育至三级卵泡。由于晚期二级卵泡与早期三级卵泡的生长受到促性腺激素的促进,又称为促性腺激素反应性卵泡。此期卵泡主要发生卵泡膜细胞与颗粒细胞的快速增殖与功能性分化。伴随着优势卵泡的确立,优势卵泡卵母细胞完成减数分裂重启前的物质积累后即重启减数分裂,并将在LH峰的作用下完成排卵,此期卵泡称为预排卵卵泡。卵泡发育至三级卵泡后,其正常生长发育需要促性腺激素的参与,又称为促性腺激素依赖性卵泡。因此,不同发育阶段的卵泡其自身形态结构特征以及对生长发育所需的条件是有显著差异的,正是这些差异导致不同阶段卵泡体外培养难度的巨大差别。小鼠二级卵泡体外培养体系早在20世纪就已经很成熟^[28]。Bishonga等^[29]通过比较发现,小鼠腔前卵泡直径越大其体外培养成腔时间越短,囊腔形成率越高。Eppig和O'Brien^[1]通过结合组织培养与卵泡培养,首次实现了小鼠原始卵泡来源后代的获得。卵巢组织培养的优势在于可以维持卵泡的卵巢环境,与卵巢内细胞-卵泡、卵泡-卵泡间的互作。同时,减少培养体系对卵泡发育的不利影响,实现早期腔前卵泡在不完善的培养基成分对其造成累积性功能损伤前向二级卵泡的过度。由于对卵泡发生机制认识不清,目前,早期腔前卵泡的体外培养尚未突破卵巢(皮质)培养的瓶颈。Obata等^[30]和Niwa等^[31]尝试通过培养12.5-dpc胎鼠卵巢组织获得完成二次减数分裂的卵母细胞均未成功。直至2006年,Shen等^[22]通过结合体内移植与体外培养首次成功获得了12.5-dpc胎鼠卵巢减数分裂前原始生殖细胞来源的健康小鼠后代。肾包膜下含有丰富的血管,移植的卵巢组织能够快速重建血管连接,接受受体鼠机

体的动态调节,实现卵泡的募集与卵泡/卵母细胞发生。因卵泡发生机制尚未探明,早期卵泡的培养还需借助卵巢组织培养甚至异位移植来完成向二级卵泡的过渡。

4.2 培养条件对腔前卵泡体外培养的影响

4.2.1 共培养对腔前卵泡体外发育的影响

通过单独培养能对卵泡的发育状况进行清晰的观察与调整,一般不会因培养基中养分耗尽和(或)代谢废物积累对卵泡造成不良影响。但是,单独培养的卵泡失去了卵泡-卵泡、卵巢体细胞-卵泡间的接触与细胞分泌因子间的互补调节功能。细胞分泌因子不足以及卵泡间通信的中断将影响卵泡的正常生长发育,对卵母细胞减数分裂成熟能力的获得产生不利影响。多卵泡共培养能够在一定程度上模拟卵巢环境,建立卵泡间的物质交换和细胞分泌因子间的相互补充。但多卵泡共培养容易发生卵泡间的聚合现象,影响卵泡的进一步发育。同时,液滴中养分消耗与代谢产物积聚过快,是共培养存在的主要不足之处。Hornick等^[32]将小鼠多个腔前卵泡包裹于凝胶中进行3D共培养,既避免了卵泡间的相互融合,又显著提高了卵泡的成活率、直径增长率和成腔率,以及卵母细胞减数分裂重启率,证明了细胞分泌因子对卵泡发育的促进作用。Heidari等^[33]发现,小鼠成纤维细胞同样能够通过促进颗粒细胞的增殖提高体外培养腔前卵泡的成活率与增加类固醇激素的生产。该研究进一步说明,目前腔前卵泡培养体系中缺乏有效的细胞因子。而体细胞-卵泡或卵泡-卵泡的共培养能够有效地弥补单独培养的不足。

4.2.2 氧分压对腔前卵泡体外发育的影响

氧气环境对于细胞的健康生长具有重要的影响,培养环境中的氧气量是否适宜直接决定细胞的状态。Wycherley等^[34]通过比较倒置培养系统与常规培养系统对小鼠腔前卵泡体外发育的影响发现,倒置培养系统(高氧)培养的腔前卵泡直径增长率及细胞增殖能力均显著高于普通培养法(低氧),说明培养体系中氧含量的不足可能是制约卵泡体外培养的一个重要因素。Hu等^[35]研究发现,5%氧分压培养的卵泡卵母细胞成熟前死亡率和染色体错配率均显著高于20%氧分压体系。Silva等^[36]发现,山羊腔前卵泡在5%氧分压下的成腔率与减数分裂重启率显著低于20%氧分压,证明高氧更有利于山羊腔前卵泡的生长发育。Morimoto等^[37]发现,高氧同样更加有利于人卵巢皮质中早期腔前卵泡的

体外发育。Martelli等^[38]发现,猪class 3级卵泡膜细胞层内开始出现微血管并逐渐网络化,为卵泡提供更多的养分及氧气供应,以满足卵泡发育的需要。虽然小鼠体内卵巢血氧水平在5%左右^[35],但生长期卵泡对氧气的摄取量可能远高于这一水平。因此,提高培养体系中氧气比例可以有效地促进腔前卵泡的体外生长与发育。

4.2.3 其他因素对腔前卵泡体外发育的影响

进行体外培养的卵泡会产生大量的代谢废物,需及时清理,否则会对卵泡发育产生不良影响。Magalhaes等^[39]研究发现,培养基的换液频率直接影响山羊腔前卵泡发育状态。每2d半量换液一次较每6d半量换液一次培养的卵泡在卵泡活力、成腔率以及完全生长卵母细胞率上均显著高于后者。因卵泡通常培养于液滴中,培养基在培养过程中蒸发较快,且体外操作过程中液滴pH很容易改变。因此,在液滴表面覆盖矿物油可以避免培养基蒸发和操作过程中培养基pH改变对卵泡的影响。Anckaert等^[40]发现,覆盖矿物油培养卵泡的液滴中氨浓度显著高于未覆盖矿物油组。但高浓度的氨积累对卵泡的成活率、卵母细胞直径增长率、卵母细胞成熟率以及卵母细胞印记基因并无影响。

4.3 培养基对腔前卵泡体外发育的影响

4.3.1 基础培养基对体外培养腔前卵泡的影响

研究人员已开发出minimum essential medium (α -MEM)^[13,42]、McCoy's 5a medium^[14]、TCM 199^[7,43]、Weymouth medium MB752^[21]与North Carolina State University 23 medium (NCSU23)^[5-6]等多种基础培养基。基础培养基主要由氨基酸、维生素、无机盐以及葡萄糖、丙酮酸盐、酚红等成分组成。因组成成分的差异,不同培养基培养腔前卵泡的效果也不同。Hovatta等^[17]发现,Earle's solution(含丙酮酸钠)较 α -MEM培养基能够显著提高人卵巢皮质中腔前卵泡的存活率。Mao等^[43]证实猪腔前卵泡在TCM199培养基中生长速度显著高于NCSU23培养基,但NCSU23培养基较TCM199培养基能够显著促进猪卵泡囊腔的形成。O'Brien等^[21]发现, α -MEM较Weymouth培养基能够显著提高小鼠腔前卵泡来源卵母细胞的卵裂率及囊胚形成率。基础培养基成分的差异以及相同成分浓度的高低将直接影响培养效果。O'Brien等^[21]研究表明,Weymouth培养基更适合早期卵泡的培养,而 α -MEM培养基较适合于卵泡培养的后期阶段。效果上的差异可能是由于葡萄糖浓度的差异导致的。Weymouth培养

基中葡萄糖浓度为 27.8 mmol/L, 而 α -MEM 中葡萄糖浓度为 5.5 mmol/L。提示我们, 不同发育阶段腔前卵泡对葡萄糖的需求量是有差异的。同样, Abedelahi 等^[44]发现, 10 ng/mL 的亚硒酸钠较其他浓度对卵泡直径的增加及卵母细胞的成熟促进效果最佳。而 Andrade 等^[45]发现 50 μ g/mL 抗坏血酸 (ascorbic acid, VC) 较其他浓度能够更好地促进牛原始卵泡的激活与后期发育的维持。随着卵泡发生机制的逐渐明朗, 培养基的组分将会进一步调整与完善。

4.3.2 促性腺激素对体外培养腔前卵泡的影响

众多调控卵泡发生的因素中, 促性腺激素 (FSH、LH) 对卵泡的正常生长发育发挥至关重要的作用。因此, 根据卵泡对促性腺激素的反应性又将卵泡分为促性腺激素非依赖性卵泡、促性腺激素反应性卵泡和促性腺激素依赖性卵泡。性腺轴与卵泡间调控与反馈通路的阻断, 导致卵泡培养体系中需添加外源促性腺激素来维持与促进卵泡的发育。Kreeger 等^[46]发现, 在无促卵泡素条件下, 早期二级卵泡成活率大于 70%, 而大腔前卵泡成活率小于 40%。卵泡发育是一个复杂的动态调控过程, 不同发育阶段卵泡对促性腺激素的需求是有差异的。目前, 腔前卵泡培养体系中普遍采用固定的 FSH 浓度, 而这显然不适于不同阶段卵泡的正常需求。Li 等^[47]发现, 高浓度的 FSH 会降低小鼠卵母细胞与胚胎发育潜能。Saraiva 等^[8]通过比较发现, 阶段性调整 FSH 浓度能够显著提高卵泡的存活率与成腔率, 减少卵母细胞过早排出率。而促黄体素则对卵泡生长产生不利影响。Silva 等^[48]发现, 短暂添加 LH 能够提高山羊腔前卵泡的成活率, 但长时间添加则会对卵母细胞的减数分裂重启产生不利影响。高浓度 LH 处理显著影响卵泡直径的增长与囊腔的形成^[49]。Orisaka 等^[50]发现, 高浓度 LH 通过抑制颗粒细胞内 FSH 受体的表达, 降低卵泡细胞对 FSH 的敏感性, 进而抑制卵泡生长。

4.3.3 细胞因子的影响

卵泡由卵泡膜细胞、颗粒细胞和卵母细胞三种细胞构成, 三种细胞相互支持, 共同维持卵泡的正常生长发育。研究表明, 卵泡发生早期的主要事件是卵母细胞的生长以及卵泡膜细胞的募集与颗粒细胞的增殖, 而卵母细胞分泌因子在此过程中发挥主要调控作用^[51-52]。伴随着卵泡发育, 卵母细胞生长速度逐渐减慢, 卵泡膜细胞与颗粒细胞完成功能性分化并开始分泌相应的细胞因子调控卵泡卵母细胞的生长。

生长分化因子 9 (growth differentiation factor 9, Gdf9) 与骨形态发生蛋白 15 (bone morphogenetic protein 15, BMP15) 是研究较多的 2 个卵母细胞分泌因子。它们在初级卵泡的卵母细胞中开始出现, 在整个卵泡发生阶段均有表达。作为细胞有丝分裂促进因子, Gdf9 与 BMP15 对早期卵泡生长和颗粒细胞的增殖与分化发挥重要作用。Gdf9 基因敲除鼠卵泡发生阻滞于初级卵泡阶段, 颗粒细胞的分化以及卵母细胞的减数分裂成熟能力被显著抑制^[53]。BMP15 在促进颗粒细胞增殖与分化的同时, 还能够促进颗粒细胞中 KL mRNA 的表达, 以及参与初级卵泡向二级卵泡过渡的调节^[54]。

作为颗粒细胞分泌因子, 酪氨酸激酶受体 (tyrosine kinase receptor, Kit) 与其配体 (tyrosine kinase receptor ligand, KL)、抗缪勒管激素 (anti-mullerian hormone AMH)、胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factor, IGF-1) 参与卵泡发生中的许多重要事件。Kit 参与原始卵泡的激活^[55], 是卵泡突破初级卵泡继续发育的必需条件^[56]。研究发现, AMH 缺失小鼠发育卵泡数量显著高于野生型鼠。进一步研究表明, AMH 通过降低芳香化酶以及 LH 受体 mRNA 表达水平来发挥对卵泡生长的抑制, 防止卵巢早衰^[57]。IGF-1 在除原始/初级卵泡的颗粒细胞外的各个时期卵泡的山羊卵母细胞和颗粒细胞中均有表达^[58], 能够有效地维持腔前卵泡的活性, 刺激原始卵泡向初级卵泡的转变。IGF-1 对卵巢功能的维持同样发挥调控功能^[59]。Ginther 等^[60]发现, IGF 系统对于可能的优势和亚优势卵泡卵泡液因子浓度的改变发挥至关重要的作用, 可能主导马优势卵泡的选择与排卵。

根据“两细胞-两促性腺激素假说”, 卵泡膜细胞在卵泡发生过程中的最主要功能是通过分泌雌激素合成底物雄激素来发挥对卵泡的支持功能。现有研究表明, 卵泡膜细胞还通过分泌骨形态发生蛋白 3/4/7 (bone morphogenetic protein 3/4/7, BMP3/4/7) 发挥对卵泡的调控作用。卵泡膜细胞通过分泌 BMP3/4/7 对自身雄激素的合成以及颗粒细胞内 P450c17 mRNA 水平、类固醇急性调节蛋白以及 3 β -羟基类固醇脱氢酶进行调整, 避免高浓度雄激素可能导致的多囊卵巢综合征的发生^[61]。同时, BMP4/7 还通过激活 Smad 1/5/8 通路对卵巢颗粒细胞间隙连接蛋白 43 (connexin 43, Cx43) 表达水平以及细胞间缝连接通信活性进行调整^[62]。在卵泡发生过程中, 还有众多的细胞因子参与共同调节卵泡

的发育, 相关作用如表 2。

5 结语

虽然目前已开发出多种腔前卵泡分离与培养方法, 且各有针对性, 但是, 应用效果依然不太理想, 尤其在大型哺乳动物中, 还缺乏有效、经济、稳定

的腔前卵泡体外培养体系。进一步优化腔前卵泡的分离与培养方法, 完善培养基成分, 规避相关因素对体外培养卵泡的不良影响, 并引入动态培养模式, 更真实地模拟体内环境是解决目前腔前卵泡体外培养中存在问题的关键, 也是进一步研究卵泡发育的努力方向。

表2 不同因子对腔前卵泡发育的影响

因子	物种	影响	阶段	参考文献
Kit Ligand +FSH	Goat	维持结构完整, 促生长	/	Lima等 ^[13]
Activin A	Human	促生长, 抗凋亡	早期囊状卵泡	Telfer等 ^[14]
T4+FSH+ IGF-I+GH	Sheep	促生长	桑葚胚	Arunakumari等 ^[7]
EGF+FSH	Bovine	促生长	/	Saha等 ^[63]
LIF+FSH	Caprine	促生长, 促成熟	MII期卵母细胞	Luz等 ^[64]
FGF-2+FSH	Caprine	维持结构完整, 促生长	/	Matos等 ^[65]
GH	Caprine	促进成腔	桑葚胚	Magalhães等 ^[66]
Insulin+FSH	Mice	Insulin抑制生长, FSH促生长	/	Sun等 ^[67]
CNP	Mice	促生长	/	Sato等 ^[68]

注: Activin A, 激活素A; T4, 甲状腺素; EGF, 表皮生长因子; LIF, 白血病抑制因子; FGF2, 成纤维细胞生长因子2; GH, 生长激素; Insulin, 胰岛素; CNP, C型利钠肽。

[参 考 文 献]

- [1] Eppig JJ, O'Brien MJ. Development *in vitro* of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol Reprod*, 1996, 54(1): 197-207
- [2] dela Peña EC, Takahashi Y, Katagiri S, et al. Birth of pups after transfer of mouse embryos derived from vitrified preantral follicles. *Reproduction*, 2002, 123(4): 593-600
- [3] Kagawa N, Kuwayama M, Nakata K, et al. Production of the first offspring from oocytes derived from fresh and cryopreserved preantral follicles of adult mice[J/OL]. *Reprod BioMed Online*, 2007, 14(6): 693-9
- [4] Zhang ZP, Liang GJ, Zhang XF, et al. Growth of mouse oocytes to maturity from premeiotic germ cells *in vitro*. *PLoS One*, 2012, 7(7): e41771
- [5] Wu J, Emery BR, Carrell DT. *In vitro* growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. *Biol Reprod*, 2001, 64(1): 375-81
- [6] Wu J, Carrell DT, Wilcox AL. Development of *in vitro*-Matured oocytes from porcine preantral follicles following intracytoplasmic sperm injection. *Biol Reprod*, 2001, 65(5): 1579-85
- [7] Arunakumari G, Shanmugasundaram N, Rao VH. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. *Theriogenology*, 2010, 74(5): 884-94
- [8] Saraiva MV, Rossetto R, Brito IR, et al. Dynamic medium produces caprine embryo from preantral follicles grown *in vitro*. *Reprod Sci*, 2010, 17(12): 1135-43
- [9] Xu J, Lawson MS, Yeoman RR, et al. Secondary follicle growth and oocyte maturation during encapsulated three-dimensional culture in rhesus monkeys: effects of gonadotrophins, oxygen and fetuin. *Hum Reprod*, 2011, 26(5): 1061-72
- [10] Cortvrindt R, Smits J, Van Steirteghem AC. *In vitro* maturation, fertilization and embryo development of immature oocytes from early preantral follicles from prepubertal mice in a simplified culture system. *Hum Reprod*, 1996, 11(12): 2656-66
- [11] Wan XY, Zhu JB, Zhu YP, et al. A novel method for toxicology: *in vitro* culture system of a rat preantral follicle. *Toxicol Health*, 2011, 27(7): 637-45
- [12] Gutierrez CG, Ralph JH, Telfer EE, et al. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture *in vitro*. *Biol Reprod*, 2000, 62(5): 1322-8
- [13] Lima IM, Celestino JJ, Faustino LR, et al. Dynamic medium containing kit ligand and follicle-stimulating hormone promotes follicular survival, activation, and growth during long-term *in vitro* culture of caprine preantral follicles. *Cells Tissues Organs*, 2012, 195(3): 260-71
- [14] Telfer EE, McLaughlin M, Ding C, et al. A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. *Hum Reprod*, 2008, 23(5): 1151-8
- [15] Demeestere I, Delbaere A, Gervy C, et al. Effect of preantral follicle isolation technique on *in-vitro* follicular growth, oocyte maturation and embryo development in mice. *Hum Reprod*, 2002, 17(8): 2152-9
- [16] Oktay K, Briggs D, Gosden RG. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *J Clin Endocr Metab*, 1997,

- 82(11): 3748-51
- [17] Hovatta O, Silye R, Abir R, et al. Extracellular matrix improves survival of both stored and fresh human primordial and primary ovarian follicles in long-term culture. *Hum Reprod*, 1997, 12(5): 1032-6
- [18] Newton H, Picton H, Gosden RG. *In vitro* growth of oocyte-granulosa cell complexes isolated from cryopreserved ovine tissue. *J Reprod Fertil*, 1999, 115(1): 141-50
- [19] Hornick JE, Duncan FE, Shea LD, et al. Isolated primate primordial follicles require a rigid physical environment to survive and grow *in vitro*. *Hum Reprod*, 2012, 27(6): 1801-10
- [20] Nayudu PL, Fehrenbach A, Kiesel P, et al. Progress towards understanding follicle development *in vitro*: appearances are not deceiving. *Arch Med Res*, 2001, 32(6): 587-94
- [21] O'Brien MJ, Pendola JK, Eppig JJ. A revised protocol for *in vitro* development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their developmental competence. *Biol Reprod*, 2003, 68(5): 1682-6
- [22] Shen W, Zhang D, Qing T, et al. Live offspring produced by mouse oocytes derived from premeiotic fetal germ cells. *Biol Reprod*, 2006, 75(4): 615-23
- [23] Xu M, Kreeger PK, Lonnie DS, et al. Tissue-engineered follicles produce live, fertile offspring. *Tissue Eng*, 2006, 12(10): 2739-46
- [24] Amorim CA, Langendonck AV, David A, et al. Survival of human preantral follicles after cryopreservation of ovarian tissue, follicular isolation and *in vitro* culture in a calcium alginate matrix. *Hum Reprod*, 2009, 24(1): 92-9
- [25] Hirao Y, Nagai T, Kubo M, et al. *In vitro* growth and maturation of pig oocytes. *J Reprod Fertil*, 1994, 100(2): 333-9
- [26] Sharma GT, Dubey PK, Meur SK. Survival and developmental competence of buffalo preantral follicles using three-dimensional collagen gel culture system. *Anim Reprod Sci*, 2009, 114(1-3): 115-24
- [27] Heise M, Koepsel R, Russell AJ, et al. Calcium alginate microencapsulation of ovarian follicles impacts FSH delivery and follicle morphology. *Reprod Biol Endocrinol*, 2005, 3: 47
- [28] Cortvrindt R, Smits J, Van Steirteghem AC. *In-vitro* maturation, fertilization and embryo development of immature oocytes from early preantral follicles from prepuberal mice in a simplified culture system. *Hum Reprod*, 1996, 11(12): 2656-66
- [29] Bishonga C, Takahashi Y, Katagiri S, et al. *In vitro* growth of mouse ovarian preantral follicles and the capacity of their oocytes to develop to the blastocyst stage. *J Vet Med Sci*, 2001, 63(6): 619-24
- [30] Obata Y, Kono T, Hatada I. Gene silencing: maturation of mouse fetal germ cells *in vitro*. *Nature*, 2002, 418(6897): 497
- [31] Niwa K, Takano R, Obata Y, et al. Nuclei of oocytes derived from mouse parthenogenetic embryos are competent to support development to term. *Biol Reprod*, 2004, 71(5): 1560-7
- [32] Hornick JE, Duncan FE, Shea LD. Multiple follicle culture supports primary follicle growth through paracrine-acting signals. *Reproduction*, 2013, 145(1): 19-32
- [33] Heidari M, Malekshah AK, Parivar K, et al. Effect of fibroblast co-culture on *in vitro* maturation and fertilization of mouse preantral follicles. *Int J Fertil Steril*, 2011, 5(1): 1-8
- [34] Wycherley G, Downey D, Kane MT, et al. A novel follicle culture system markedly increases follicle volume, cell number and oestradiol secretion. *Reproduction*, 2004, 127(6): 669-77
- [35] Hu Y, Betzendahl I, Cortvrindt R, et al. Effects of low O₂ and ageing on spindles and chromosomes in mouse oocytes from preantral follicle culture. *Hum Reprod*, 2001, 16(4): 737-48
- [36] Silva CM, Matos MH, Rodrigues GQ, et al. *In vitro* survival and development of goat preantral follicles in two different oxygen tensions. *Anim Reprod Sci*, 2010, 117(1-2): 83-9
- [37] Morimoto Y, Oku Y, Sonoda M, et al. High oxygen atmosphere improves human follicle development in organ cultures of ovarian cortical tissues *in vitro*. *Hum Reprod*, 2007, 22(12): 3170-7
- [38] Martelli A, Bernabo N, Berardinelli P, et al. Vascular supply as a discriminating factor for pig preantral follicle selection. *Reproduction*, 2009, 137(1): 45-58
- [39] Magalhaes DM, Fernandes DD, Mororo MB, et al. Effect of the medium replacement interval on the viability, growth and *in vitro* maturation of isolated caprine and ovine pre-antral follicles. *Reprod Domest Anim*, 2011, 46(1): 134-40
- [40] Anckaert E, Adriaenssens T, Romero S, et al. Ammonium accumulation and use of mineral oil overlay do not alter imprinting establishment at three key imprinted genes in mouse oocytes grown and matured in a long-term follicle culture. *Biol Reprod*, 2009, 81(4): 666-73
- [41] Barbara B, Russo V, Cecconi S, et al. *In Vitro* grown sheep preantral follicles yield oocytes with normal nuclear-epigenetic maturation. *PLoS One*, 2011, 6(11): e27550
- [42] Duarte AB, Araujo VR, Chaves RN, et al. Bovine dominant follicular fluid promotes the *in vitro* development of goat preantral follicles. *Reprod Fert Dev*, 2012, 24(3): 490-500
- [43] Mao JD, Wu GM, Smith MF, et al. Effects of culture medium, serum type, and various concentrations of follicle-stimulating hormone on porcine preantral follicular development and antrum formation *in vitro*. *Biol Reprod*, 2002, 67(4): 1197-203
- [44] Abedelahi A, Salehnia M, Allameh AA. The effects of different concentrations of sodium selenite on the *in vitro* maturation of preantral follicles in serum-free and serum supplemented media. *J Assist Reprod Genet*, 2008, 25(9-10): 483-8
- [45] Andrade ER, van den Hurk R, Lisboa LA, et al. Effects of ascorbic acid on *in vitro* culture of bovine preantral follicles. *Zygote*, 2012, 20(4): 379-88

- [46] Kreeger PK, Fernandes NN, Woodruff TK, et al. Regulation of mouse follicle development by follicle stimulating hormone in a three-dimensional *in vitro* culture system is dependent on follicle stage and dose. *Biol Reprod*, 2005, 73(5): 942-50
- [47] Li M, Zhao Y, Zhao CH, et al. High FSH decreases the developmental potential of mouse oocytes and resulting fertilized embryos, but does not influence offspring physiology and behavior *in vitro* or *in vivo*. *Hum Reprod*, 2013, 28(5): 1309-23
- [48] Silva CM, Castro SV, Faustino LR, et al. Moment of addition of LH to the culture medium improves *In Vitro* survival and development of secondary goat pre-antral follicles. *Reprod Dom Anim*, 2011, 46(4): 579-84
- [49] Park KE, Ku SY, Jung KC, et al. Effects of urinary and recombinant gonadotropins on *in vitro* maturation outcomes of mouse preantral follicles. *Reprod Sci*, 2013, 20(8): 909-16
- [50] Orisaka M, Hattori K, Fukuda S, et al. Dysregulation of ovarian follicular development in female rat: LH decreases FSH sensitivity during preantral-early antral transition. *Endocrinology*, 2013, 154(8): 2870-80
- [51] Li R, Norman RJ, Armstrong DT, et al. Oocyte-secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells. *Biol Reprod*, 2000, 63(3): 839-45
- [52] Diaz FJ, Wigglesworth K, Eppig JJ. Oocytes determine cumulus cell lineage in mouse ovarian follicles. *J Cell Sci*, 2007, 120(8): 1330-40
- [53] Chang H, Brown CW, Matzuk MM. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor- β superfamily. *Endocr Rev*, 2002, 23(6): 787-823
- [54] Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, et al. Mutations in oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage sensitive manner. *Nat Genet*, 2000, 25(3): 279-83
- [55] Parrott JA, Skinner MK. Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinology*, 1999, 140(9): 4262-71
- [56] Kissel H, Timokhina I, Hardy MP, et al. Point mutation in kit receptor tyrosine kinase reveals essential roles for kit signaling in spermatogenesis and oogenesis without affecting other kit responses. *EMBO J*, 2000, 19(6): 1312-26
- [57] Rajpert-De Meyts E, Jorgensen N, Graem N, et al. Expression of anti-Müllerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999, 84(10): 3836-44
- [58] Martins FS, Saraiva MV, Celestino JJ, et al. Expression of protein and mRNA encoding insulin growth factor-I (IGF-I) in goat ovarian follicles and the influence of IGF-I on *in vitro* development and survival of caprine preantral follicles. *Anim Reprod*, 2010, 7(4): 349-61
- [59] Rodriguez SS, Schwerdt JI, Barbeito CG, et al. Hypothalamic insulin-like growth factor-I gene therapy prolongs estral cyclicity and protects ovarian structure in middle-aged female rats. *Endocrinology*, 2013, 154(6): 2166-73
- [60] Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO, et al. Critical role of insulin-like growth factor system in follicle selection and dominance in mares. *Biol Reprod*, 2004, 70(5): 1374-9
- [61] Glistler C, Richards SL, Knight PG. Bone Morphogenetic proteins (BMP) -4, -6, and -7 potently suppress basal and luteinizing hormone-induced androgen production by bovine theca interna cells in primary culture: could ovarian hyperandrogenic dysfunction be caused by a defect in thecal BMP signaling? *Endocrinology*, 2005, 146(4): 1883-92
- [62] Chang HM, Cheng JC, Leung PC. Theca-derived BMP4 and BMP7 down-regulate connexin43 expression and decrease gap junction intercellular communication activity in immortalized human granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013, 98(3): 437-45
- [63] Saha S, Shimizu M, Geshi M, et al. *In vitro* culture of bovine preantral follicles. *Anim Reprod Sci*, 2000, 63(1-2): 27-39
- [64] Luz VB, Santos RR, Araujo VR. The effect of LIF in the absence or presence of FSH on the *in vitro* development of isolated caprine preantral follicles. *Reprod Domest Anim*, 2012, 47 (3): 379-84
- [65] Matos MH, Bruno JB, Rocha RM, et al. *In vitro* development of primordial follicles after long-term culture of goat ovarian tissue. *Res Vet Sci*, 2011, 90(3): 404-14
- [66] Magalhães DM, Duarte AB, Araújo VR, et al. *in vitro* production of a caprine embryo from a preantral follicle cultured in media supplemented with growth hormone. *Theriogenology*, 2011, 75(1): 182-8
- [67] Sun LL, Sun ZY, Zhang P, et al. Effect of insulin on oogenesis from mouse fetal germ cells in a serum-free 3D culture system[J/OL]. *Reprod Biomed Online*, 2010, 20: 11-25
- [68] Sato Y, Cheng Y, Kawamura K, et al. C-type natriuretic peptide stimulates ovarian follicle development. *Mol Endocrinol*, 2012, 26(7): 1158-66