

## 一种稳定的人卵母细胞体外培养成熟技术

谢庆东<sup>1</sup>, 曾丽萍<sup>2</sup>, 黄天华<sup>1,\*</sup>

(1. 汕头大学医学院生殖医学研究中心, 广东 汕头 515041; 2. 汕头大学医学院第一附属医院妇产科, 广东 汕头, 515031)

**【摘要】**背景与目的: 建立一种稳定的人卵母细胞体外培养成熟技术。材料与方法: 取术后部分卵巢组织, 穿刺卵泡获得未成熟卵母细胞, 在含激素的培养基中培养 24~36 h。结果: 经培养的人卵母细胞符合成熟的判断标准: ①含有第一极体; ②胞浆匀称, 色浅, 颗粒均匀。结论: 该方法稳定, 提示未成熟人卵母细胞经体外培养成熟在人类辅助生殖领域具有广泛的应用前景。

**【关键词】**卵母细胞; 体外培养成熟

中图分类号: R39433

文献标识码: B

文章编号: 1004-616X(2004)03-0183-02

A Stable Technique of Maturation *in vitro* Culture of Human OocytesXIE Qing-dong<sup>1</sup>, ZENG Li-ping<sup>2</sup>, HUNAG Tian-hua<sup>1,\*</sup>

(1. Research Center for Reproductive Medicine Shantou University Medical College Shantou 515041, China;  
2. Department of Maternity, First Affiliated Hospital, Shantou University Medical College, Shantou 515041, China)

**【ABSTRACT】**BACKGROUND AIM: To establish a stable *in vitro* culture technique of human oocytes. MATERIAL AND METHODS: Immature human oocyte were achieved by puncture follicle and cultured for 24 to 36 hours in HTF Medium(containing hMG). RESULTS: Oocytes after cultured were judged as mature according to the two criteria: the first polar body existed; the cytoplasm was symmetric, light and granule uniformly. CONCLUSION: The method was stable, this result suggested that the maturation *in vitro* of immature human oocyte could have great potential for human assisted reproduction.

**【KEY WORDS】**oocyte; maturation *in vitro* culture

1978年, Steptoe 和 Edwards<sup>[1]</sup>用体外受精与胚胎移植(IVF-ET)技术成功地诞生第1例“试管婴儿”, 为不孕症的临床治疗与基础研究开辟了一个新的领域。目前, 获取 IVF-ET 所用的卵母细胞有两种途径: ①激素超排(HIO); ②体外培养成熟(CVM)。前者是指用激素刺激卵巢, 诱导多个卵泡生长, 以获取较多在体内成熟的卵母细胞用于 IVF-ET。后者是指不用激素刺激, 直接从卵巢中取得未成熟卵母细胞, 在体外培养成熟后用于 IVF-ET。一般经激素超排的卵母细胞 85%~90% 已经成熟, 到达第二次减数分裂中期(M II), 是目前 IVF-ET 所用卵母细胞的主要来源。但其缺点是促性腺激素的使用给患者带来副作用, 包括: 体重增加、胀气、恶心与呕吐, 情绪波动, 且

体内保持高雌激素水平增加了患乳腺癌、卵巢癌的风险。此外, 引起不孕的某些疾病如多囊卵巢综合征(PCOS)患者对外源性促性腺激素非常敏感, 若用激素超排来获取卵母细胞, 将会诱发卵巢过度刺激综合征危及生命<sup>[2]</sup>。因此, 建立一种稳定的卵母细胞体外培养成熟技术也成为临床迫切需要解决的课题。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料

1.1.1 实验材料 术后卵巢组织。Quinn's Advantage(tm) Fertilization (HTF) Medium 培养基(SAGE BioPharma, USA)

1.1.2 试剂及配制 试剂: Menotrophin(hMG, Manu-

收稿日期: 2004-02-27; 修订日期: 2004-04-03

基金项目: 国家自然科学基金(No. 30170481)

作者简介: 谢庆东(1973-), 男, 广东省揭阳人, 助理实验师, 研究方向: 生殖医学。

\* 通讯作者: Tel: 0754-8900845, E-mail: thhuang@stu.edu.cn

factured by Laboratoires Serono S.A.), 胎牛血清 (Sigma)。配制:①将 hMG (75 IU/支)溶于 1 ml 无菌生理盐水。将此 1 ml 原液加到 9 ml HTF 中配成溶液 I(含 hMG 7.5 IU/ml), 按每 100  $\mu$ l 分装后贮于 -70  $^{\circ}$ C 备用。②取 2 ml 胎牛血清加到 8 ml HTF 中, 配制成溶液 II (含有 20 % 血清的 HTF)。③取 100  $\mu$ l 溶液 I 加入溶液 II, 配成溶液 III, 并用 0.2  $\mu$ m 滤膜 (Flow Laboratories) 过滤除菌。④用过滤后的溶液 III, 在 35 mm  $\times$  10 mm 培养皿中制备 5 个液滴 (每个液滴 50  $\mu$ l), 覆以石蜡油 (Sigma), 置于 37  $^{\circ}$ C, 5 % CO<sub>2</sub> 的培养箱中备用。

**1.2 方法** ①将术后卵巢组织标本置于 37  $^{\circ}$ C 灭菌生理盐水中。②用 37  $^{\circ}$ C 生理盐水将卵巢组织洗涤干净。③用注射器所带 16 # 针头穿刺肉眼可见卵泡, 吸取含有卵母细胞的卵泡液。④将卵泡液排入无菌培养皿中, 在红色光透射的解剖镜下, 用微吸管将卵母细胞移入备用的培养液滴中, 置于培养箱 (5 %, 37  $^{\circ}$ C) 中培养。⑤8~12 h 后检查卵母细胞, 若观察到卵周间隙, 示体外培养成熟成功可能性大。⑥继续培养 16-24 h, 取出卵母细胞镜检。

**1.3 成熟卵母细胞标准**<sup>[3]</sup> 判别成熟卵母细胞的标准: ①有第一极体; ②胞浆匀称, 色浅, 颗粒均匀。

## 2 结果

体外培养 24~36 h 后, 取出卵母细胞镜下观察, 可清晰见到色浅、胞浆及颗粒均匀、含有第一极体的成熟人卵母细胞 (图 1)。

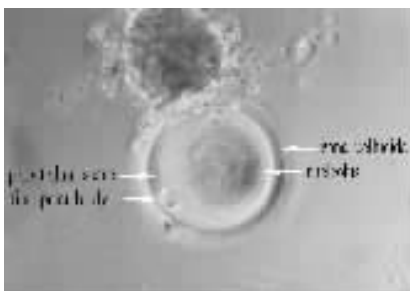


图 1 成熟人卵母细胞  
Figure 1 Matured human oocyte

## 3 讨论

卵母细胞成熟是一个极其复杂的过程, 包括核成熟与细胞质成熟。它们受 *c-mos*、*c-raf* 等基因的调控, 在类固醇激素和多种因子的参与下, 通过卵丘细胞、颗粒细胞作用完成成熟过程。Ca<sup>2+</sup>释放可能参与卵母细胞成熟的最后过程<sup>[2]</sup>。

**3.1 尽可能模拟体内卵母细胞成熟的内环境** 由于体内卵母细胞成熟过程中, 促性腺激素刺激卵丘颗粒细胞分泌各种物质。这些物质不仅控制核成熟

也在细胞质的成熟过程中起重要作用, 因此, 我们在培养基中加入了人绝经期促性腺激素 (hMG)。hMG 中含有 FSH 和 LH 这两种促性腺激素, 而 FSH 和 LH 对于人类卵母细胞体外成熟有着极其重要的作用, FSH 和 LH 可促进颗粒细胞增殖、膨散, LH 和受体结合, 可促进卵母细胞成熟, 大大提高了体外培养成熟率。

**3.2 未成熟卵母细胞的大小** 卵母细胞的大小决定卵母细胞恢复减数分裂和完成成熟的能力, 有研究发现<sup>[4]</sup>, 卵母细胞直径小于 105  $\mu$ m 的只有 1/3 恢复减数分裂, 而直径大于 105  $\mu$ m 的有 2/3 可恢复减数分裂和完成成熟。随着卵母细胞直径的增大 90~125  $\mu$ m, 其恢复和完成成熟的能力逐渐增强, 因此在选材时尽可能选择直径大于 105  $\mu$ m 的未成熟卵母细胞进行培养。

**3.3 供卵者的年龄** 年龄是否影响卵母细胞体外成熟率, 目前仍有争议。但多数认为随着年龄的增长, 卵母细胞在体内受氧自由基的不利影响越久, 其染色体发生异常行为或结构变化的可能性越大, 从而影响体外成熟<sup>[5]</sup>。因此在选材时应注意不要选择年龄太大的患者标本。

**3.4 避免紫外光及短波** 应尽可能避免紫外光、短波和其他光线的照射, 在操作过程中, 因它们会引起卵母细胞蜕变。我们在使用柔和的红色光作为解剖镜的光源, 从而得到满意的实验结果。

**3.5 注意** ①应用新鲜标本, 经冷藏后的卵巢组织取得的卵母细胞很难体外培养成熟。②全过程操作时间不宜太久, 以免卵母细胞蜕化使实验失败。

人卵母细胞体外培养成熟技术不仅没有激素超排的多种弊端, 而且可以冻存起来建立卵子库, 既避免了胚胎冻存带来的很多法律与伦理问题, 又为患者所需卵母细胞提供了更多的选择<sup>[2]</sup>, 因此具有广阔的应用前景。

## 参考文献:

- [1] Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo [J]. *Lancet*, 1978, 2: 366
- [2] Kwang YC, Chian RC. Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use [J]. *Hum Reprod Update*, 1998, 4(2): 103-120.
- [3] 卢惠霖、卢光琇. 人类生殖与生殖工程 [M]. 郑州: 河南科学技术出版社出版, 2001. 109.
- [4] Edwards RG, Wales DS, Edin PH. Maturation in vitro of human ovarian oocytes [J]. *Lancet*, 1965, 11: 926.
- [5] 谢常青, 林戈, 杨苏安. 人类不成熟卵母细胞体外成熟影响因素初探 [J]. *生殖与避孕*, 2000, 20(3): 156-160.