第1卷 第5期 中国农业大学学报 1996年9月
Vol. 1 No. 5 Journal of China Agricultural University Sep. 1996

小鼠胚胎卵巢体外培养中卵细胞的生长及其数量的调节*

夏国良
(中国农业大学生物学院,北京 100094)

摘要：利用胚胎卵巢体外长期培养技术研究了小鼠卵巢中卵细胞的生长发育状况。材料取自B6D2雌小鼠F1代胚胎,胎龄为11.5日和13.5日。用Orcein染色法鉴别雌雄。分离出的卵巢培养12～14 d。5 d后换一次培养液,以后每2 d换1次。培养8 d后,13.5日龄胚胎卵巢中卵细胞已形成与体内相似的有规则的分布。在卵巢皮质部有大量的卵母细胞和少量体细胞,而在髓质部只有少量的卵母细胞和大量的体细胞。大量的未生长的小卵母细胞(直径<25 μm)紧密地分布在皮质的外侧,而生长卵母细胞则主要分布在皮质的内侧和髓质。11.5日龄胚胎卵巢经过10～12 d培养,没有形成上述分布规律,所有观察到的卵细胞都是生长中的卵母细胞。卵细胞数量也显著低于13.5日龄胚胎的卵巢(34.4±6.53比566.7±49.5)。用IGF-I和FSH处理11.5日龄胚胎卵巢可显著增加其卵细胞的数量(分别为88对55,$P<0.01$和140对20,$P<0.005$)。较老龄的胚胎卵巢组织对于11.5日龄胚胎卵巢卵细胞数量均有促进作用,其中以16.5日龄胚胎卵巢的作用较强(165对65,$P<0.005$)。实验结果表明小鼠胚胎发育到达11.5～13.5日龄时期对于卵巢来说是获得形成卵巢内卵细胞分布规律能力的重要时期。11.0日龄胚胎卵巢缺乏某些因子的作用,因而不能在体外正常发育。

关键词：小鼠胚胎；卵巢；卵细胞；生长发育
中图分类号：Q1132.4

哺乳动物中,进入减数分裂期的卵母细胞一般位于卵巢皮质的内侧。当这些卵母细胞达到双线期时,其周围开始有体细胞围绕并生长形成卵泡。尽管人们对这种结构早已有认识,但仍然不知道其形成的机制。小鼠胚胎性腺的分化在形态上只有到13日龄时才能辨别。体外培养时只有达到一定发育阶段的卵巢,其生殖细胞才能进入减数分裂[1]。有实验表明卵巢中开始生长的卵细胞数量与未生长的卵细胞的数量成反比关系[2]。许多卵细胞在减数分裂过程中死亡,一但进入双线期,只有那些被颗粒细胞包围的卵细胞才能成活[3]。目前人们还不了解是什么原因使这些早期胚胎卵巢在体外培养时造成大量卵细胞死亡。尽管对于胚胎卵巢的组织学研究有大量资料报道,但对体外培养时卵巢中卵细胞的发育还了解甚少。

本实验的目的是利用体外培养方法来研究胚胎卵巢中卵细胞的生长发育,探索卵细胞在不同胚胎期的分布和数量的变化,并进一步研究影响卵细胞数量的因素。

1 材料与方法

1.1 材料 MEM培养液、胎牛血清购自Scotland的Flow公司,谷氨酰胺为Sigma产品,FSH,LH和IGF-I为Organon公司产品。

收稿日期：1995-09-22
*此项目由国家教委回国人员启动基金资助

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2 方法

1.2.1 卵巢分离 将 11.5 和 13.5 日龄的 B6D2 F1 小鼠胚胎取出。胚胎日龄的确定是以母鼠交配后出现阴道栓的日子定为 1 日龄。根据 Byskov 和 Saxen 的方法鉴定 11.5 日龄胚胎性别(4)。胚胎卵巢取出后将与卵巢组织相连的中肾组织清除。

1.2.2 卵巢培养 将分离的卵巢分别培养在多孔培养板中(Nunc),每孔含一个卵巢和培养液 0.5 mL(MEM,含 2%胎牛血清,2 毫摩尔谷氨酰胺,100 单位/毫升青霉素和 100 μg/mL链霉素)。在培养箱中(37℃,5%CO_2)预培养 5d 使卵巢贴于培养板底,然后更换新鲜的培养液,以后每隔两天更换一次。在激素和生长因子处理组加入不同的激素和生长因子以观察其对 11.5 日龄胚胎卵巢中卵细胞数量的影响,在用老龄胚胎卵巢处理 11.5 日龄胚胎卵巢实验中,分别用13.5,14.5 和 16.5 日龄胚胎的卵巢与 11.5 日龄胚胎卵巢共培养,观察 11.5日龄胚胎卵巢中卵细胞数量的变化。

1.2.3 卵细胞观察与数量测定 在整个培养阶段,当培养 5 d 后开始对卵巢进行显微镜定期观察。当 11.5 日龄和 13.5 日龄卵巢被分别培养 14 d 和 12 d(相当于胚胎发育到出生后 6 日),在倒置显微镜下观察并计算所有卵巢中卵细胞的数量。当卵巢培养到 10 d 时,观察不同卵巢中卵细胞的生长和分布情况。

1.2.4 数据统计 所有数据经计算机统计评定各组之间的差异情况。统计作图程序为 Sigma Plot 软件。每个实验至少重复 4 次。

2 结果

2.1 卵细胞生长分布类型 当胚胎卵巢培养到接近胚胎出生日时(分别培养 8 d 和 6 d),在 11.5 日和 13.5 日龄胚胎卵巢中可见卵细胞发育到减数分裂前期。当卵巢培养到相当于出生后 2 日龄时(分别培养 10 d 和 8 d),13.5 日龄胚胎卵巢中的卵细胞分布类似于成体内卵巢中卵细胞的分布。大量的未生长卵母细胞分布在皮质层的外侧,而生长的大卵母细胞则集中在皮质层内侧和髓质层。这种类似正常卵巢内卵细胞的分布状况在 11.5 日龄胚胎卵巢中没有观察到,所观察到的卵细胞几乎都是生长卵母细胞(>25 μm)(图 1)。

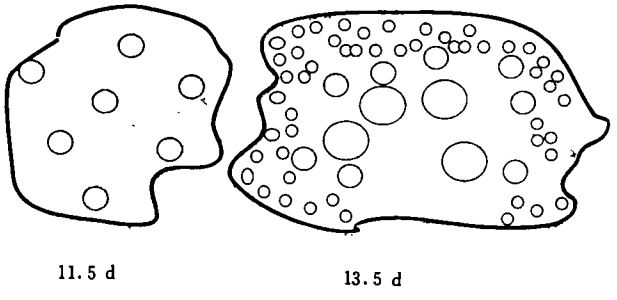

图 1 胎龄不同的卵巢经培养后表现出不同的卵细胞分布情况

Fig. 1 Oocytes appeared in different growth pattern by cultured mouse fetal ovaries

2.2 卵细胞数量 当卵巢培养 12 d 或 14 d(相当于出生后 6 d),在显微镜下用计数器可容易地计算出每个卵巢中卵母细胞的数量。13.5 日龄胚胎卵巢中卵母细胞的数量约 560,其中大于 25 μm 的生长卵母细胞只占 6%,而 11.5 日龄的胚胎卵巢中卵母细胞的数量极显著地低于 13.5 日龄的,且都是生长卵母细胞(图 2)。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.3　FSH 和 IGF-Ⅰ促进 11.5 日龄胚胎卵巢卵母细胞数量的增加　20 ng/mL 的 FSH 和 40 ng/mL 的 IGF-Ⅰ在体外均可促进 11.5 日龄胚胎卵巢中卵母细胞数量的增加（FSH 为 140 ± 17.21，IGF-Ⅰ为 90±14.95，对照组为 38.6±9.5；P 值分别小于0.005和 0.01，每个实验重复 8 次）（图 3）。

2.4　老龄胚胎卵巢中含有促进卵细胞生长发育的因子　将 11.5 日龄胚胎卵巢培养在分别含有 13.5，14.5 和 16.5 日龄胚胎卵巢的培养液中，可见11.5日龄胚胎卵巢中卵母细胞的数量显著增加，其中以 16.5 日龄胚胎卵巢的作用较强（165 ± 17.3 对 38.6 ± 9.53；P<0.005），13.5日龄胚胎卵巢也可以刺激其卵母细胞数量的增加（89±15.01 对 38.6±9.53；P<0.05，每个实验重复 8 次）（图 4）。

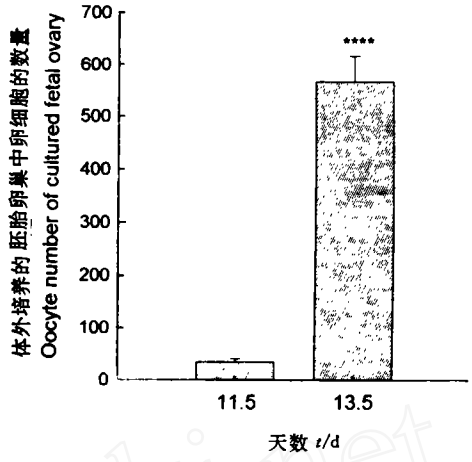

图 2　胎龄不同的卵巢经培养后卵细胞的数量明显不同

Fig. 2　Different oocyte number from different aged fetal ovary

**** 每个值表示平均数加标准误实验重复数为 20. P<0.001

**** The value indicates mean±SE(n=20). P<0.001

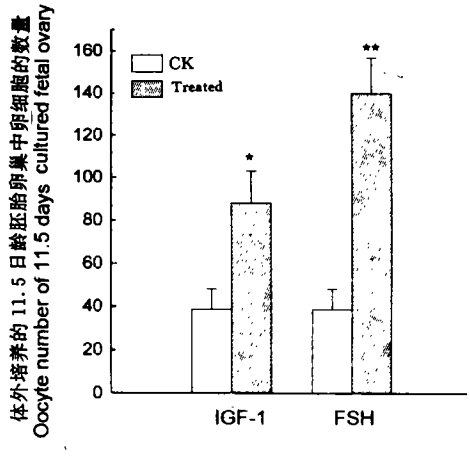

图 3　IGF-1 和 FSH 促进体外培养的 11.5 日龄胚胎卵巢卵细胞数量的增加

Fig. 3　IGF-1 and FSH increasing oocyte number of 11.5 day fetal ovary in vitro

3　讨论

本实验结果表明：小鼠胚胎卵巢在体外培养时，当培养到相当于胎儿出生日时，其卵细胞即已开始进入减数分裂前期。小鼠胚胎发育到 11.5 日至 13.5 日龄时期对于卵巢来说是形成卵巢内卵母细胞分布规律的重要时期。11.5 日龄胚胎卵巢缺少某些因子，因此不能形成这种分布规律。13.5 日龄胚胎卵巢中具有分泌促进卵细胞生长发育的因子。FSH 和 IGF-Ⅰ有促进卵母细胞数量增加的作用。

Peters 和 Clarke 的研究表明小鼠卵细胞的生长发育是在出生后立刻开始的，几天内即形成原始卵泡[3]。我们的体外研究结果证实了这种看法，并进一步说明卵巢内卵母细胞的分布规律是在胚胎时期就已存在。Godin 等人认为 14.5 日龄小鼠胚胎卵巢中的生殖细胞开始进行减数分裂[5]，这一点与我们体外培养得到的结果相吻合。我们的结果还证实了Peters

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

和 McNatty 提出的哺乳动物卵巢中生长卵母细胞的数量与卵巢中未生长卵母细胞的数量成反比[6]，并表明获得这种关系的能力在小鼠胚胎早期(13.5 日龄)就已形成。早于这个时期(如 11.5 日龄)时，由于卵巢中缺乏某些促卵细胞生长发育的因子，大量的卵原细胞丢失，只有生长卵母细胞存在，说明未生长卵细胞的数量对于生长卵母细胞的数量具有限制作用(13.5日龄胚胎卵巢中生长卵细胞数量只占 6%)。Tavendale 等人用 13.5 日龄胚胎卵巢与同龄的睾丸培养液培养时证明睾丸中含有降低卵母细胞数量的因子[7]，我们的结果则证实在较老龄胚胎的卵巢中含有促进卵母细胞数量增加的因子。这可能是由于老龄胚胎卵巢中已具备了分泌某种促减数分裂成熟的因子[8]。11.5 日龄胚胎卵巢中由于缺乏这种因子的分泌，使大量的生殖细胞不能进入减数分裂而死亡。此外，FSH 和 IGF-Ⅰ可能是这种因子的刺激物。

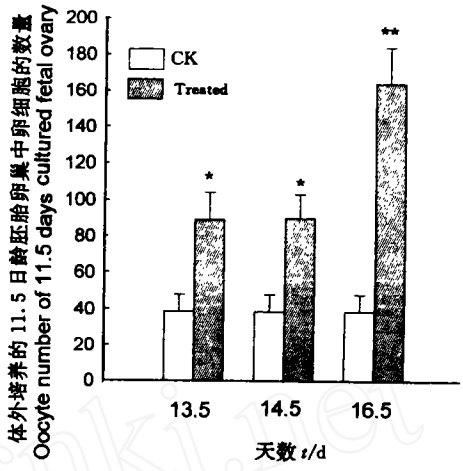

图 4 老龄胚胎卵巢共培养促进 11.5 日龄胚胎卵巢卵细胞数量的增加

Fig. 4 Aged fetal ovary increase oocyte number of 11.5 P.C fetal ovary

感谢丹麦国家教学研究医院 Byskov 教授无偿提供实验药品和材料。

参 考 文 献

1 Byskov AG. Does the rete ovarii act as a trigger for the onset of meiosis? Nature, 1974 252:396～397

2 Krarup T, Pedersen T, Faber M. Regulation of oocyte growgh in the mouse ovary. Nature, 1969 224: 187～188

3 Peters H, Clarke JR. The development of the ovary from birth to maturity in the bank vole (*Clethrionomys glareolus*) and the vole (*Microtus agrestia*). Anat. Rec 1974 179:241～251

4 Byskov AG, Saxen L. Induction of meiosis in fetal mouse testis in vitro. Development Biology 1976 52:193～200

5 Godin I, Wylie C, Heasman J. Genital ridges exert long-range effects on mouse primordial germ cell numbers and direction of migration in culture. Development, 1990 108:357～363

6 Peters H, McNatty KP. A correlation of struction and function in mammals. in: The Ovary (edited by Peters and McNatty). Granada publish, London. 1980

7 Tavendale S J, Mackay S, Smith RA. Oocyte numbers are reduced in developing mouse ovaries cultured in testis-conditioned medium. J Anat. 1992 180:289～296

8 Byskov AG. Control of meiosis, a summary. Archiv Anat Micr Morphol Exper. 1985 74: 17～18

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Mouse Embryo Oocyte Growth Pattern and Number Regulation in Vitro*

Xia Guoliang
(College of Biological Sciences, Beijing 100094)

Abstract: The present works are conducted to observe oocyte growth/initiation in vitro, using a culture system of fetal mouse ovaries aged 11.5 days (morphological undifferentiated), 13.5 days (ovary recognizable). The ovaries from $B_6D_2F_1$ embryo were cleaned from extraovarian mesonephric tissue and cultured for 12 to 14 days in minimum essential medium with 2% fetal calf serum. The medium was changed 5 days latter at first time, then renewed every second days. All ovaries flattened out during growth allowing inspection for small and growth oocyte under an inverted microscope during the culture period. When the 13.5 day-old embryo ovary was cultured for 8 days, a cortex and a medulla developing with small non-growing oocyte in the outer part of the cortex and growing oocyte at inner part was observed. During the culture, the growing oocyte at inner part of cortex, usually surrounded by several layers of somatic cells. It was revealed that, in culture of 11.5 days p.c., the geographic growgh patten of oocyte was not appeared and the number of oocyte is significantly reduced compared with 13.5 day－old embryo ovary (34.4±6.53 to 566.7±49.50). FSH and IGF-1 could stimulate the oocyte number increase by cultured 11.5day-old embryo ovary when the medium was supplemented with FSH and IGF-1, respectively (140±17.21; 90± 14.95 to 38.6±9.5 of control). The coculture with older embryo ovaries could also significantly increase oocyte number of 11.5 day-old embryo ovaries. The older the enbryo was, the stronger the stimulatory action was observed. Our results indicate it seems that the period from 11.5 to 13.5 p.c. is a crucial time for ovary to gain the ability to form a cortex with a growth gradient and for how many oocytes can enter folliculogenesis.

Key words: mouse embryo; ovary; oocyte; growth and development

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net