

# FSH 对人腔前卵泡体外生长的影响

施旭东<sup>1</sup>, 范必勤<sup>2</sup>, 王公金<sup>2</sup>, 曹步凯<sup>2</sup>, 谭笑梅<sup>3</sup>,  
陈华<sup>3</sup>, 孙贝加<sup>4</sup>, 王金锋<sup>5</sup>, 糜祖煌<sup>6</sup>, 陈杰<sup>1</sup>

(1. 南京农业大学动物生理生化研究室, 南京 210095)

(2. 江苏省农科院牧医所胚胎工程实验室, 南京 210014)

(3. 南京市妇幼保健院, 南京 210004)

(4. 徐州市第四人民医院, 徐州 221009)

(5. 徐州市妇幼保健院, 徐州 221009)

(6. 无锡市克隆遗传技术研究所, 无锡 214026)

[摘要] 为探讨 FSH 对人腔前卵泡体外生长的影响, 为此通过在培养液中加入不同浓度的 FSH, 观察卵泡存活天数和卵泡发育增大, 并测定卵泡  $E_2$  的分泌量. 结果发现: 卵泡体外存活天数, 对照组(无 FSH)为  $2.80 \pm 1.69$  d, I、II、III 组( FSH 浓度为 0.5 IU/mL, 1.0 IU/mL, 2.0 IU/mL)分别为  $5.36 \pm 0.63$ 、 $5.47 \pm 2.50$ 、 $8.13 \pm 4.19$  d, 与对照组相比, 分别为  $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$ . 卵泡增大比率, 对照组为 20.00%, I、II、III 组分别为 35.70%、60.00%、81.25%, 与对照组相比分别为  $P > 0.05$ 、 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ .  $E_2$  分泌量, 对照组为  $49.94 \pm 20.91$  pg/mL, I、II、III 组分别为  $108.63 \pm 41.06$ 、 $315.53 \pm 93.39$ 、 $438.24 \pm 187.61$  pg/mL. 对照组与 I 组相比,  $P < 0.001$ ; I 与 II 组相比,  $P < 0.001$ ; II 与 III 组相比,  $P < 0.05$ . 可见 FSH 能使卵泡体外存活天数延长, 卵泡发育增大, 卵泡  $E_2$  分泌增加, 并大致呈正相关关系.

[关键词] 人; FSH; 腔前卵泡; 体外培养;  $E_2$

[中图分类号] Q492; [文献标识码] A; [文章编号] 1001-4616(2001)01-0095-06

## 0 引言

卵泡刺激素(FSH)为垂体分泌的一种糖蛋白激素, 其主要作用是促进颗粒细胞增生分化, 调节卵泡的发育<sup>[1]</sup>. 卵泡由一个位于中心的卵母细胞和其周围的颗粒细胞和卵泡膜细胞组成一个发育功能单位, 在垂体分泌的促性腺激素、卵巢自身分泌的性激素及各种生长因子的共同调控下, 产生成熟卵子和分泌性激素, 表现其生殖功能和内分泌功能. 当整个卵泡在体外适宜的环境中培养时, 可以像在体内那样发育生长, 并产生激素<sup>[2]</sup>. 尽管有许多证据表明 FSH 是促进卵泡生长发育的最重要因素之一<sup>[3]</sup>, 但其资料大部分来源于对啮齿类动物的研究<sup>[4]</sup>. 人卵巢卵泡分离方法的建立, 为研究人类卵泡生长发育及调控提供了可能. 在本实验中我们利用人卵泡体外培养的方法, 研究 FSH 对人卵泡生长发育的影响.

收稿日期 2000-07-10

作者简介 施旭东, 1959—, 女, 徐州市妇幼保健院副主任医师, 现为南京农业大学动物医学院博士研究生, 主要从事生殖生理、胚胎工程的研究.

## 1 材料与方法

### 1.1 血清制备

人脐带血清(Human Cord Serum, HCS)的制备参照 Fan 等<sup>[5]</sup>的方法.人脐带血取自在南京市妇幼保健院和徐州市妇幼保健院分娩的健康产妇胎盘,待血液自然凝固后,取析出的血清,离心 30 min(转速为 3 000 r/min)去除小血凝块和细胞碎片,56℃灭活 30 min, -20℃保存待用.

### 1.2 培养液

基础培养液为 Ham's F-10,加入青霉素 100 IU/mL、链霉素 50  $\mu$ g/mL,并添加 15% 的 HCS.基础培养液作为对照组,在基础培养液中分别加入 FSH 使其浓度为 0.5 IU/mL(Ⅰ组)、1.0 IU/mL(Ⅱ组)和 2.0 IU/mL(Ⅲ组)作为试验组.

### 1.3 卵泡的获取

卵巢组织来自 1999 年 2 月至 2000 年 5 月南京市妇幼保健院和徐州市第四人民医院妇产科手术切除的卵巢,取其正常部分,去除髓质、黄体和白体.用含青霉素 200 IU/mL、链霉素 200  $\mu$ g/mL 的磷酸缓冲盐溶液(Phosphate-buffered Saline, PBS)清洗 3 次后,切成 0.5 mm 见方的碎块,置于含 0.1%(w/v)胶原酶和 5% HCS 的 Ham's F-10 培养液中,胶原酶液 2 倍体积于皮质组织块体积,在 37℃水浴中消化 1 h.然后用含 15% HCS 的 Ham's F-10 培养液清洗 3 次以中止胶原酶的作用.再将卵巢皮质碎块分次在显微操作仪上进行显微解剖以分离收集卵泡.以基膜(Basal Lamina)完整、卵母细胞轮廓清楚、颗粒细胞紧密清晰、直径 > 90  $\mu$ m 卵泡作为收集对象.

### 1.4 卵泡的培养

获取的卵泡用含 15% HCS 的 Ham's F-10 清洗后,随机分组,移入对照组及试验组培养液微滴中,微滴上覆矿物油,在 37℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱中进行培养.每 24 h 换液 1 次.

### 1.5 卵泡的观察

培养中的卵泡每 24 h 在倒置显微镜下观察 1 次,记录其基膜、卵泡轮廓及卵母细胞形态,有无卵母细胞逸出(Extrusion)等情况.以基膜模糊或消失、卵泡轮廓不规则、卵泡内出现黑色坏死区和卵母细胞变形、固缩或逸出视为退化<sup>[6]</sup>.当出现卵母细胞逸出或出现其他 2 种及以上的退化迹象时定为卵泡闭锁,并记录.

每隔 5 d,在倒置显微镜下,用预先校准的目镜测微尺对卵泡直径进行测量,记录其直径变化.将在 5 d 的培养过程中直径增大超过 5  $\mu$ m 定为卵泡增大.

### 1.6 卵泡分泌雌二酮(E<sub>2</sub>)测定

每 24 h 收集更换下来的培养液, -20℃保存,集中测定 E<sub>2</sub> 含量. E<sub>2</sub> 测定选用放射免疫分析法(放免药盒购自无锡克隆遗传技术研究所),采用双抗体沉淀,  $\gamma$  闪烁计数.

## 2 结果

### 2.1 培养液中不同浓度 FSH 对卵泡体外存活时间的影响

体外培养的卵泡在无 FSH 的基础培养液中,仅能存活  $2.80 \pm 1.69$  d,继之出现退化迹象(见图 1).当培养液中添加不同浓度 FSH 时,均可明显延长卵泡在体外存活时间(见表 1).FSH 浓度为 0.5 IU/mL 时,卵泡存活时间为  $5.36 \pm 0.63$  d;FSH 浓度为 1.0 IU/mL 时,卵泡体外存活时间为  $5.47 \pm 2.50$  d;当 FSH 浓度增加至 2.0 IU/mL 时,卵泡体外存活的时间明显延长为  $8.13 \pm 4.19$  d,卵泡在体外存活时间与 FSH 浓度大致呈正相关关系.在 FSH 浓度为 2.0 IU/mL 的试

验组中,有 2 枚卵泡存活达 22 d 以上,形态正常,体积增大。

表 1 不同浓度 FSH 对人腔前卵泡体外存活时间的影响

组别	卵泡数/个	生存时间 ( $\bar{X} \pm S$ )/d
对照组(无 FSH)	10	$2.80 \pm 1.69^a$
I 组(FSH 0.5 IU/mL)	14	$5.36 \pm 0.63^b$
II 组(FSH 1.0 IU/mL)	15	$5.47 \pm 2.50^c$
III 组(FSH 2.0 IU/mL)	16	$8.13 \pm 4.19^d$

注 经  $t$ -检验 a 与 d 的  $P < 0.001$  ;a 与 c 的  $P < 0.01$  ;a 与 b、b 与 d、d 与 c 的  $P < 0.05$  ;b 与 c 的  $P > 0.05$ 。

2.2 培养液中不同浓度 FSH 对卵泡增大的影响

培养液中无 FSH 时,仅有 20.00% 的卵泡增大。当培养液中增加了 FSH 时,卵泡增大的比率明显提高(见表 2)。FSH 浓度为 0.5 IU/mL 时,卵泡增大的比率有增加的趋势,达 35.71%,但与对照组相比无显著性差异;当 FSH 浓度达 1.0 IU/mL 时,其卵泡增大比率为 60.00%,较对照组有显著性差异;当 FSH 浓度升高至 2.0 IU/mL 时,其卵泡增大的比率为 81.25%,与对照组相比,有极其显著性差异。卵泡增大的比率与 FSH 浓度呈剂量依赖性关系。在 FSH 2.0 IU/mL 的试验组中,有 2 例培养 5 d 后,其直径分别从 100  $\mu\text{m}$ 、200  $\mu\text{m}$  增大到 130  $\mu\text{m}$ 、220  $\mu\text{m}$ ,并在培养的第 9 天排出卵母细胞,相差显微镜下显示生发泡破裂(Germinal Vesicle Breakdown, GVBD),表明出现了减数分裂的恢复,已基本发育成熟。

2.3 培养液中不同浓度 FSH 对卵泡分泌  $E_2$  的影响

当卵泡在无 FSH 的基础培养液中培养时,分泌  $E_2$  为  $49.94 \pm 20.91$  pg/mL。在培养液中添加不同浓度的 FSH,均可增加卵泡  $E_2$  的分泌(见表 3)。当培养液中 FSH 浓度为 0.5 IU/mL 时, $E_2$  的分泌达  $108.63 \pm 41.06$  pg/mL。培养液中 FSH 的浓度增加至 1.0 IU/mL 时, $E_2$  的分泌亦增至  $315.53 \pm 93.39$  pg/mL;当 FSH 浓度增加到 2.0 IU/mL 时, $E_2$  的分泌则高达  $438.24 \pm 187.61$  pg/mL,各组相比均有显著性差异。

表 2 不同浓度 FSH 对人腔前卵泡增大的影响

组别	卵泡数 /个	增大卵泡数 /个	增大卵泡比率 /%
对照组(无 FSH)	10	2	20.00 <sup>a</sup>
I 组(FSH 0.5 IU/mL)	14	5	35.71 <sup>b</sup>
II 组(FSH 1.0 IU/mL)	15	9	60.00 <sup>c</sup>
III 组(FSH 2.0 IU/mL)	16	13	81.25 <sup>d</sup>

注 经 Chi-square 检验 a 与 d 的  $P < 0.01$  ;a 与 c、b 与 d 的  $P < 0.05$  ;  
a 与 b、b 与 c、c 与 d 的  $P > 0.05$ 。

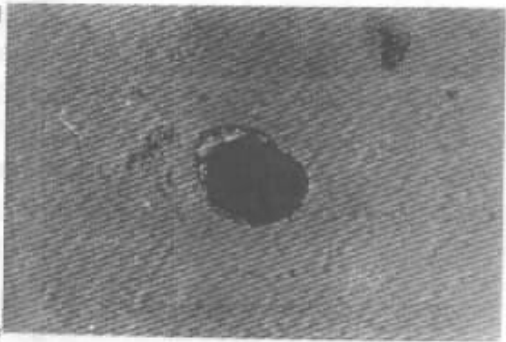


图 1 退化卵泡( $\times 100$ )

表 3 不同浓度 FSH 对人腔前卵泡分泌  $E_2$  的影响

组别	卵泡数 /个	卵泡 24 h 分泌 $E_2$ 量 ( $\bar{X} \pm S$ )(pg/mL)
对照组(无 FSH)	10	$49.94 \pm 20.91^a$
I 组(FSH 0.5 IU/mL)	14	$108.63 \pm 41.06^b$
II 组(FSH 1.0 IU/mL)	15	$315.53 \pm 93.39^c$
III 组(FSH 2.0 IU/mL)	16	$438.24 \pm 187.61^d$

注 经  $t$ -检验 a 与 b 的  $P < 0.001$  ;b 与 c 的  $P < 0.001$  ;c 与 d 的  $P < 0.05$ 。

3 讨论

卵泡在体外培养时,是由卵母细胞、颗粒细胞共同组成一个发育单位而生长发育的,细胞间存在着信息交流和物质交换<sup>[7]</sup>。只有维持卵泡的完整性,才能确保卵泡的双重功能,即为卵母细胞提供生长和发育的微环境,同时对性激素刺激作出反应,将生长和成熟的信息转换传递给卵母细胞<sup>[8]</sup>。胶原酶消化获取腔前卵泡的方法在小鼠<sup>[8]</sup>、仓鼠<sup>[9]</sup>等动物上已得到成功的应用。由于人卵巢组织含有丰富的胶原纤维,单一胶原酶短时间消化的方法不足以使胶原纤维分  
万方数据

解. Roy 等<sup>[10]</sup>首次报导了用胶原酶加脱氧核糖核酸酶消化人卵巢组织以获得腔前卵泡,但消化时间长达 36 h,并且长时间处于 4℃ 的低温,这对腔前卵泡的活力有不良影响,同时酶长时间消化可破坏腔前卵泡的卵泡膜细胞,影响卵泡的正常生理功能<sup>[11]</sup>. 1997 年 Abir 等<sup>[11]</sup>首次利用镜下显微解剖的方法获取人腔前卵泡并培养. 但人卵巢组织结构致密,透光度差,镜下显微解剖困难且费力耗时. 本实验取二者之长,采用短时间胶原酶消化,在卵巢组织坚韧度降低、透光度增强的基础上,应用显微解剖的方法成功获取人腔前卵泡. 当添加 FSH 为 2.0 IU/mL 时,在体外培养的人腔前卵泡存活达  $8.13 \pm 4.19$  d (其中最长达 22 d 以上),并伴有卵泡的增大及  $E_2$  分泌,说明该方法所获取的卵泡具有体外存活的能力. 目前,胶原酶消化加显微解剖获取人腔前卵泡的方法尚无文献报导.

当培养液中无 FSH 时,卵泡仅能存活  $2.80 \pm 1.69$  d 左右,添加 FSH,使卵泡存活天数延长. 随着 FSH 浓度的增加,卵泡在体外存活的时间也由  $5.36 \pm 0.63$  d 逐渐延长到  $8.13 \pm 4.19$  d,试验组卵泡的存活天数较对照组均表现显著性增加,且其增加程度与 FSH 浓度密切相关. Monniaux 等<sup>[12]</sup>发现,具有二层或二层以上颗粒细胞的大鼠卵泡,其颗粒细胞膜上已存在 FSH 结合位点. 人卵泡直径在 90  $\mu\text{m}$  以上时,绝大部分有一层以上的颗粒细胞<sup>[13]</sup>,并已进入生长阶段. 颗粒细胞膜上出现 FSH 受体. 当培养液中添加 FSH 时,可与其受体结合,通过第二信使,传递信号,促进细胞间缝隙联接<sup>[14]</sup>,加快细胞间的物质信息交换,使之适应环境变化,表现为存活天数增加. 同时信息、物质交换的增加,可提供给卵母细胞生长发育的信号和物质,使其增大并发育. 颗粒细胞接受信息后表现为增殖分化,颗粒层增厚,细胞总数增加. 整体表现为卵泡增大,卵母细胞生长发育并成熟. FSH 2.0 IU/mL 试验组中 2 例卵泡直径迅速增大,卵母细胞减数分裂恢复,出现 GVBD,达到近成熟水平,正是 FSH 作用的表现(见图 2、图 3).

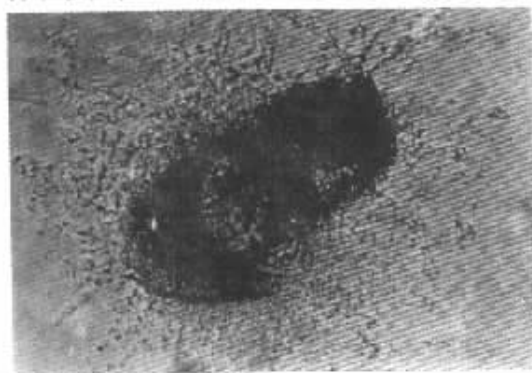


图 2 卵丘细胞扩散( $\times 100$ )

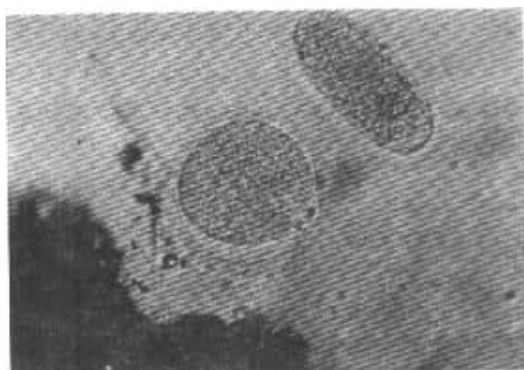


图 3 卵母细胞排出,生发泡破裂( $\times 200$ )

Tilly 等<sup>[15]</sup>在培养大鼠的颗粒细胞时发现,在体外培养过程中,颗粒细胞所含 FSH 受体呈下降趋势,用 FSH 处理可防止这种下降. 而增加 FSH 浓度时,可增加其受体数目. 我们实验中的对照组,由于缺乏 FSH 而出现的卵泡迅速退化,可能是其 FSH 受体减少引起细胞间的联接减弱,不能适应外界环境变化所致.

在实验中,我们还发现 FSH 为 0.5 IU/mL 与 FSH 为 1.0 IU/mL 时,在增加卵泡存活天数上,无显著性差异. 这可能与颗粒细胞膜上受体数目饱和有关. 当 FSH 浓度为 2.0 IU/mL 时,较大剂量的 FSH 可能引起颗粒细胞膜上的受体上调,使其数目增加<sup>[15]</sup>,而出现较大的生物效应所致.



至于 FSH 对卵泡增大的作用,随着浓度的增加,卵泡增大的比率也相应增加.在浓度达 2.0 IU/mL 时,有 81.25% 的卵泡增大  $5\mu\text{m}$  以上,较对照组有显著性意义.但在浓度 0.5 IU/mL 与 1.0 IU/mL、1.0 IU/mL 与 2.0 IU/mL 之间相比无显著性差异.这说明对于卵泡的增大来说,FSH 的存在要比 FSH 浓度具有更重要的生物学意义.这与在体内较低浓度的 FSH 就能使卵泡发育生长,但要使卵泡在短时间内迅速增大,却需要一个 FSH 高峰的现象一致.FSH 2.0 IU/mL 时使 2 例卵泡直径迅速增加,并出现卵母细胞的 GVBD,证明了卵母细胞的成熟更加依赖于大剂量 FSH 的刺激.

在实验中,我们通过对收集的培养液进行放免测定,发现  $E_2$  的分泌随着培养液中 FSH 浓度的增加而增加.在无 FSH 时,培养液中  $E_2$  的浓度为  $49.94 \pm 20.91\text{ pg/mL}$ ;FSH 浓度为 0.5 IU/mL 时, $E_2$  的浓度为  $108.63 \pm 41.06\text{ pg/mL}$ ;FSH 浓度增加至 1.0 IU/mL 时, $E_2$  的浓度增至  $315.53 \pm 93.39\text{ pg/mL}$ ;在 FSH 浓度达 2.0 IU/mL 时, $E_2$  的浓度也高达  $438.24 \pm 187.61\text{ pg/mL}$ ,呈明显的剂量依赖性关系,提示  $E_2$  的产生与 FSH 密切相关.本实验采用的腔前卵泡获取方法,使卵泡膜细胞的损伤降低,在培养过程中,卵泡膜细胞产生雄烯二酮,经扩散达颗粒细胞.颗粒细胞的 FSH 受体在 FSH 的作用下,经 cAMP 途径增强颗粒细胞内的芳香化酶的活性,加快了雄烯二酮转化成  $E_2$  的过程,表现为随着 FSH 浓度的增加, $E_2$  的生成也相应增加.

总之,通过本实验,初步证实人腔前卵泡体外生长发育需要 FSH 的支持.FSH 不仅能促进卵泡的生长,增加其存活天数,还能促进颗粒细胞增殖及  $E_2$  分泌,促进卵母细胞成熟,是卵泡生长发育调控的重要因子.

### [ 参考文献 ]

- [ 1 ] Cortvrindt R G ,Hu Y ,Liu J ,*et al.* Timed analysis of the nuclear maturation of oocytes in early preantral mouse follicle culture supplemented with recombinant gonadotropin[ J ]. *Fertil Steril* ,1998 ,70 :1114—1125.
- [ 2 ] Gosden R G ,Boland N I ,Spears N ,*et al.* The biology and technology of follicular oocyte development in vitro[ J ]. *Reproductive Medicine Review* ,1993 ,2 :129—152.
- [ 3 ] Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates :Facts and hypotheses[ J ]. *Endocr Rev* ,1996 ,17 :121—154.
- [ 4 ] Dekel N ,Galiani D ,Beers W H. Induction of maturation in follicle enclosed oocytes :the response of gonadotropins at different stages of follicular developmen[ J ]. *Biol Reprod* ,1988 ,38 :517—521.
- [ 5 ] Fan Biqin ,Ridha M T ,DeMayo F J ,*et al.* Culture and transplantation of preimplantation hamster embryos[ J ]. *Proceedings of Sino-Japanese Symposium on Biotechnology Journal of Agricultural Sciences* ,1986 ,2 ( Sup ) :69—77.
- [ 6 ] Nuttinck F ,Mermillod P ,Massip A ,*et al.* Characterization of in vitro growth of bovine preantral ovarian follicles :A preliminary study[ J ]. *Theriogenology* ,1993 ,39 :811—821.
- [ 7 ] Brower P T ,Schultz R M. Intercellular communication between granulosa cells and mouse oocytes :existence and possible nutritional role during oocyte growth[ J ]. *Dev Biol* ,1982 ,90 :144—153.
- [ 8 ] 李朝军 ,王斌 ,范必勤 ,等.小鼠腔前卵泡卵母细胞的体外培养、体外成熟和体外受精研究[ J ]. *南京大学学报( 自然科学)* ,1997 ,33 ( 2 ) :265—272.
- [ 9 ] Roy S K ,Greenwald G S. An enzymatic method for dissociation of intact follicles from the hamster ovary :histological and quantitative aspect[ J ]. *Biol Reprod* ,1985 ,32 :203—215.
- [ 10 ] Roy S K ,Treacy B J. Isolation and long-term culture of human preantral follicles[ J ]. *Fertil Steril* ,1993 ,59 :783—790.