

红鲫卵母细胞体外成熟和受精的研究*

石连玉 尹洪滨

(中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 哈尔滨 150070)

王国恩

(大连水产学院, 116024)

摘要 利用 17α -羟孕酮, 前列腺素及两者联合进行红鲫卵母细胞的体外培养, 结果表明, 17α -羟孕酮 ($1\mu\text{g}/\text{ml}$) 可以促进卵母细胞成熟但不能排卵。而前列腺素 ($2\mu\text{g}/\text{ml}$) 对卵母细胞的成熟没有影响, 但可以引起成熟卵母细胞的排卵。当两者联合作用时既可以成熟又能排卵并能受精发育。

关键词 红鲫, 卵母细胞, 成熟, 受精, 体外

鱼类卵母细胞体外培养技术是研究鱼类卵母细胞成熟的调控机制, 胚胎发育与分化等生殖机制的重要手段。它不仅可以用来预测雌鱼的成熟模式和繁殖功能, 用作评估常规激素质量和发挥激素应用潜力的指标, 而且可进行体外成熟卵母细胞转基因鱼的研究。提高转基因鱼的成功率。

哺乳类和两栖类的卵母细胞在离体条件下培养成熟的报导很多^[1,2]。而在鱼类只有青鳉和金鱼有报告可以在体外成熟、受精^[3]。本实验成功地将红鲫IV期中卵母细胞在体外培养成熟, 排卵并受精发育成仔鱼。

材 料 和 方 法

(一)材料

红鲫 (*Carassius auratus red variety*) 取自黑龙江水产研究所松浦试验场。培养基: NaCl 6.5g、KCl 0.14g、MgSO₄ 0.39g、CaCl₂ 0.16g 加水至 1000ml, 0.04M NaOH-Hepes 调 pH 至 7.2。用时加葡萄糖 1.0g, 小牛血清 1.0g, 庆大霉素 10mg。激素: 17α -羟孕酮 (17α -Hydroxyprogesterone, 17α -HP) (进口) 使用浓度为 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 。前列腺素 (ptostaglandin, PG) (化学名: 3-间氯苯氧基-17, 18, 19, 20 失四碳前列腺素 F_{2 α}) (上海市计划生育科学研究所生产) 使用浓度 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

(二)方法

实验鱼在无菌条件下取出卵巢, 在平衡盐液内切成小块, 每块 8-10 个滤泡, 分装入

* 本实验为农业部资助课题的一部分。沈俊宝研究员对本研究进行了指导与帮助, 特此致谢。

25ml 培养瓶内 (含激素的培养基 4ml) 每瓶装 5-6 块共 40~60 个滤泡。在 5% CO₂ 的培养箱内培养 24 小时, 温度 25℃。

(三)结果观察 培养 24 小时后, 取部分培养物去掉培养基加入透明液 (95%酒精: 福尔马林: 冰醋酸=6: 3: 1), 几秒钟后可清晰见到细胞核。根据细胞核的偏移程度, 将卵母细胞成熟度分为四期。核处于细胞正中央为 I 期, 记作 GV₁。核偏至一半时为 II 期记作 GV₂ (下同)。核达细胞边缘时为 GV₃, 核膨大消失后为 GV₄。达 GV₄ 后视为已成熟。此时 GV₄ 所占比例为成熟率。成熟的卵母细胞外被的滤泡膜破裂, 细胞逸出者为已排卵。排卵细胞占成熟细胞的比率为排卵率。

(四)人工授精 另选取已排卵的成熟卵母细胞。未排卵但滤泡膜已变薄与卵母细胞分离有空隙的成熟卵用尖镊子将滤泡膜剥去, 立即加入精液, 进行人工授精。受精卵在清水内室温孵化。

结 果 与 讨 论

不同激素对红鲫卵母细胞体外成熟与排卵的影响观察结果列表 1。人工授精 17 α -HP 和 PG 两组的受精率均为零。17 α -HP+PG 组在 36 粒受精卵中 (其中在 2 细胞期取出 10 粒进行固定) 有 17 粒发育至囊胚中期, 受精率为 65.38%。最后孵出鱼苗 13 尾。孵化率为 76.46%。

表 1 不同激素对红鲫卵母细胞体外成熟与排卵的影响

Table 1 Influence of hormones on the maturation and ovulation of oocytes cultured in vitro

组 别 Group	各成熟期卵母细胞数 Numbers of differaut stage oocytes				合计 Total	排卵数 Numbers of ovulated eggs	成熟率 Maturation (%)	排卵率 Ovulation (%)
	GV ₁	GV ₂	GV ₃	GV ₄				
对 照 Control		45	37	6	88	0	6.82	
17 α -HP (1 μ g / ml)		28	36	59	123	4	47.97	11.11
PG (2 μ g / ml)		41	38	7	86	7	8.14	100
17 α -HP(1 μ g / ml) +PG(2 μ g / ml)			9	31	40	28	77.50	90.32

从表 1 可以看出对照组的成熟率只有 6.82%, 17 α -HP 组为 47.97%, 经 x^2 显著性检验, $x^2=40.75$ 远大于 P=1% 点的 6.64, 差异性极显著。PG 与对照组的 $x^2=0.10$, 小于 P=5% 点的 0.45 无显著性差异。经同样方法检验, 17 α -HP 组的排卵率与对照组无显著性差异。PG 组的排卵率与对照组有极显著性差异。17 α -HP+PG 组的成熟率和排卵率与对照组均有极显著性差异。

上述结果说明, 17 α -HP 对红鲫卵母细胞有显著的促成熟作用, 对排卵没有影响。

PG 对红鲫卵母细胞的成熟不起作用,但可以引起成熟的卵母细胞的排卵。当 17α -HP 与 PG 联合作用时,既可以使卵母细胞成熟又可以促使其排卵,并能进行受精与发育。

绝大多数硬骨鱼类的卵母细胞的成熟,排卵是由下丘脑-垂体-卵巢轴控制的。即由脑垂体促性腺激素(GTH)诱发滤泡细胞层的鞘细胞和颗粒细胞,在 17β -羟类固醇脱氢酶(17β -HSD)的作用下合成并释放成熟类固醇激素 17α - 20β -双羟孕酮($17\alpha20\beta$ p)。卵母细胞在 $17\alpha20\beta$ p 的作用下卵核极化直至卵核消失(成熟),准备排卵。研究证明, 17α -HP 在颗粒细胞层中可以作为 $17\alpha20\beta$ p 的前身,在 20β 羟类固醇脱氢酶的作用下,转化成 $17\alpha20\beta$ p。因此 17α -HP 对红鲫卵母细胞能有促进成熟的作用。

排卵就是卵母细胞从滤泡中脱离出来的过程,我们在红鲫卵母细胞的离体培养中发现,卵母细胞完成最后成熟后,与滤泡细胞层之间形成一空隙,同时滤泡膜变得薄而透明,继而破裂卵母细胞从中脱出而排卵。这个过程一般认为是由一种水解蛋白酶的作用而引起的^[4]。这种蛋白酶是受激素控制的。在我们的实验中 17α -HP 可以引起成熟的卵母细胞与滤泡膜之间形成空隙但很小,不能引起滤泡膜破裂。当有 PG 存在时,空隙可增大并变的透明而薄,最后破裂排卵。对于未成熟的卵母细胞有 PG 的作用也不能引起排卵。在成熟类固醇激素作用下,卵母细胞成熟时,在其周围会出现一种蛋白酶原物质,这种蛋白酶原物质在卵母细胞成熟之前不存在。这种蛋白酶原物质只有在一种蛋白酶原激活物的激活下产生水解蛋白酶,从而作用于滤泡膜而排卵。我们的实验证明,PG 能够促使颗粒细胞产生这种蛋白酶原的激活物,一旦卵母细胞成熟出现蛋白酶原物质时就会使其激活产生水解蛋白酶而引起排卵。

参 考 文 献

- [1] 郑瑞珍等, 1992. 兔卵母细胞体外成熟和体外受精的研究. 动物学报, 38 (1): 64-71.
- [2] 季维智等, 1992. 猕猴卵母细胞的体外成熟、受精和培养. 科学通报, 22: 2090-2092.
- [3] 王壬学等, 1990. 从体外成熟卵母细胞获得转基因金鱼的研究. 科学通报, 18: 1422-1424.
- [4] 王义强等, 1990. 鱼类生理学, 229-255. 上海科学技术出版社.
- [5] B jalabert, A. Fostier, 1984. The modulatory effect in vitro of oestradiol- 17β , testosterone or cortisol on the output of 17α -hydroxy- 20β -dihydroprogesterone by rainbow trout by the maturational gonadotropin s-GtH. *Reprod. Nutr. Develop.* 24(2), 127-136.

A STUDY ON THE MATURATION AND FERTILIZATION OF OOCYTES OF RED CRUCIAN CARP IN VITRO

Shi Lianyu Yin Hongbin

(Heilongjiang River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070)

Wang Guoen

(Dalian Fisheries Institute, 116024)

ABSTRACT Oocytes of red crucian carp were cultured in a medium containing 17α -hydroxyprogesterone ($1\mu\text{g}/\text{ml}$), prostaglandin ($2\mu\text{g}/\text{ml}$) and combination of the two hormones. 17α -hydroxyprogesterone induced maturation of oocytes but not ovulation. Prostaglandin induced ovulation of oocytes but not maturation. The combination of 17α -hydroxyprogesterone and ptostaglandin induced maturation and ovulation of oocytes. Besides, fertilization and developmend.

KEYWORDS Red crucian carp, Oocytes, Maturation, Fertilization, In vitro