

ẢNH HƯỞNG CỦA VIỆC SỬ DỤNG DỊCH NANG NOÃN, HCG ĐẾN SỰ THÀNH THỰC NHÂN TẾ BÀO TRỨNG HEO

Võ Nguyễn Khánh Vy¹ và Nguyễn Ngọc Tấn^{1*}

Ngày nhận bài báo: 30/11/2020 - Ngày nhận bài phản biện: 27/12/2020

Ngày bài báo được chấp nhận đăng: 30/12/2020

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm đánh giá ảnh hưởng của việc sử dụng dịch nang noãn, hormone hCG (human Chorionic Gonadotropin) đến sự thành thực nhân tế bào trứng heo trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*. Phức hợp tế bào trứng-cumulus (COCs) sau khi thu từ các nang noãn có kích thước trung bình (3-7mm) có từ 2 lớp tế bào cumulus (CC) được phân chia ngẫu nhiên vào nuôi cấy thành thực trong 44 giờ với 3 môi trường nuôi cấy khác nhau: môi trường 1 (MT1): TCM199 + BSA + Kháng sinh; môi trường 2 (MT2): TCM199 + BSA + Kháng sinh + dịch nang noãn và môi trường 3 (MT3): TCM199 + BSA + Kháng sinh + Dịch nang noãn + hCG. Kết quả cho thấy tỷ lệ thành thực nhân đạt cao nhất ở nhóm COCs nuôi cấy ở MT3 (65,7%), kế đến là nhóm COCs nuôi cấy ở MT2 (40,7%) và thấp nhất ở nhóm COCs nuôi cấy ở MT1 (24,3%, $P < 0,05$). Kết quả cũng cho thấy tỷ lệ thành thực nhân của tế bào trứng heo tăng dần khi tăng nồng độ dịch nang noãn từ 0-15%. Tỷ lệ thành thực nhân cao nhất ở nhóm bổ sung 15% (70,0%), tiếp theo là nhóm bổ sung 10% (60,7%), sau đó là nhóm bổ sung 5% (45,7%) và thấp nhất ở nhóm không bổ sung (30,0%). Việc bổ sung dịch nang noãn và hormone hCG vào môi trường nuôi cấy giúp cải thiện tỷ lệ thành thực nhân tế bào trứng heo trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*, cần tiếp tục nghiên cứu sâu hơn nữa để hiểu rõ hơn về vai trò của dịch nang noãn và hCG đến sự thành thực tế bào chất và phát triển phôi sau đó.

Từ khóa: hCG, heo, dịch nang noãn, thành thực nhân.

ABSTRACT

Effect of Follicular Fluid, human Chorionic Gonadotropin on the nuclear maturation of porcine oocytes

The aim of this study was to evaluate the effect of follicular fluid (FF), human Chorionic Gonadotropin (hCG) supplementation in culture medium on porcine oocytes nuclear maturation *in vitro*. The cumulus-oocytes complexes (COCs) obtained from medium follicles (3-7mm in diameter) with ≥ 2 cumulus cell layers are randomly subjected culture in three groups based on culture medium, such as MT1: TCM199+BSA+Antibiotics, MT2: TCM199+BSA+Antibiotics+Follicular fluid, MT3: TCM199+BSA+Antibiotics+Follicular fluid+hCG. The results showed that the nuclear maturation rate was highest in MT3 grouped COCs (65.7%), then MT2 grouped COCs (40.7%) and lowest in MT1 grouped COCs (24.3%, $P < 0.05$). We also found the dose-dependent effect of follicular fluid concentration supplemented in culture medium on nuclear maturation. The maturation rate was highest ($P < 0.05$) in grouped COCs with 15% FF (70.0%) as compared to 0% FF (control group; 30.0%) or other treated groups with 5% (45.7%) and 10% (60.7%) and none significant difference between treated group with 15 and 10% of FF was found. Taken together, we conclude that supplemented both FF and hCG in the culture medium improves the nuclear maturation rate of porcine oocytes. However, in order to understand more insight into the cytoplasmic maturation and further development requires more studies.

Keywords: hCG, pig, follicular fluid, nuclear maturation.

¹ Trường Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh

* Tác giả liên hệ: TS. Nguyễn Ngọc Tấn, Giảng viên chính. Khoa Khoa học Sinh học – Trường Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh; Email: nntan@hcmuaf.edu.vn; Điện thoại: 0948 993 338

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Việc nuôi thành thực tế bào trứng *in vitro* (*In vitro* maturation-IVM) được áp dụng rộng rãi và là bước tiên quyết cho sự thành công của kỹ thuật sản xuất phôi *in vitro*, các nhà khoa học đã nỗ lực cải thiện điều kiện IVM bằng cách tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng đến sự thành thực tế bào trứng và sự phát triển phôi sau đó.

Nhiều nghiên cứu đã thử nghiệm hệ thống nuôi cấy nhằm nâng cao chất lượng của việc nuôi cấy *in vitro* bằng việc bổ sung vào môi trường nuôi thành thực tế bào trứng các hoạt chất khác nhau như Sorbitol (Lin và ctv, 2015); cAMP (Appellant và ctv, 2016); VEGF (Luo và ctv, 2002). Trong khi đó, nhóm nghiên cứu khác lại tiếp cận theo hướng tăng thu nhận những COCs có chất lượng tốt thông qua chiến lược nuôi cấy *in vitro* nang noãn chưa trưởng thành (Wu và ctv, 2011; Hirao và ctv, 2013; Mochida, 2013; Takasi và ctv, 2013) hay theo hướng cải thiện phương pháp thu nhận tế bào trứng (Wang và ctv, 2007; Davichi và ctv, 2012). Tuy nhiên khi đưa vào thực hành, các phương pháp trên gặp phải giới hạn bởi thành phần, tỷ lệ, giá thành các hoạt chất bổ sung cao và phương pháp phức tạp hơn. Sử dụng dịch nang noãn, hormone sinh sản cũng là cách tiếp cận để giải quyết vấn đề nuôi thành thực tế bào trứng trong điều kiện *in vitro*. Nhưng có rất ít thông tin cụ thể về ảnh hưởng của dịch nang noãn, hCG đến tỷ lệ thành thực nhân tế bào trứng heo. Vì thế, nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của việc sử dụng dịch nang noãn, hCG trong môi trường nuôi

cấy đến sự thành thực nhân tế bào trứng trong điều kiện *in vitro*.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu và địa điểm

Buồng trứng heo (5-7 tháng tuổi), khối lượng 80-100kg được thu nhận từ lò mổ địa phương.

Các hóa chất sử dụng chủ yếu được mua từ Công ty Sigma, ngoại trừ một số hóa chất đặc biệt được chỉ ra trong bài viết.

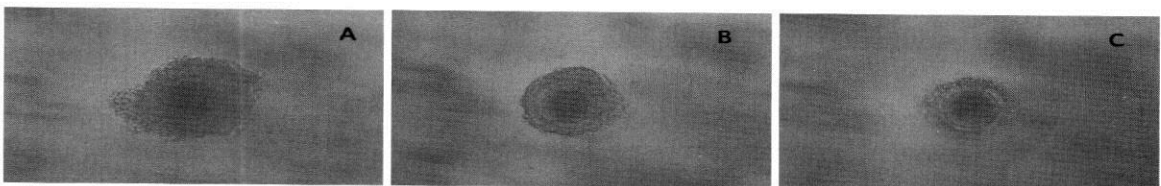
Thí nghiệm (TN) được thực hiện tại Phòng thí nghiệm Công nghệ Phôi Động vật, Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường, tòa nhà A1, trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh, từ tháng 10/2019 đến tháng 6/2020.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Thu nhận và phân loại tế bào trứng

Việc thu nhận buồng trứng và tách tế bào trứng được thực hiện theo qui trình của Nguyễn Ngọc Tấn và ctv (2019a,b).

Sau khi tách tế bào trứng từ các nang noãn có kích thước trung bình (3-7mm), các phức hợp tế bào trứng-cumulus được phân chia theo các chỉ tiêu (i) số lớp tế bào cumulus bao quanh tế bào trứng, (ii) tế bào chất trong khối COC đồng nhất và được chia thành 3 loại sau (Hình 1): Nhóm COCs có từ 3 lớp cumulus trở lên, tế bào chất đồng đều và sáng màu; nhóm COCs có 2 lớp cumulus, tế bào chất đồng đều nhưng có màu hơi tối; nhóm COCs có ít hơn 2 lớp cumulus, tế bào chất không đều, tối màu.



Hình 1. Phân loại tế bào trứng theo số lớp tế bào cumulus

(A) Tế bào trứng có >3 lớp CC, (B) Tế bào trứng có 2 lớp CC, (C) Tế bào trứng có <2 lớp CC (độ phóng đại 300 lần)

2.2.2. Đánh giá sự thành thực nhân tế bào trứng bằng nhuộm Aceto-Orcein

Phức hợp tế bào trứng-cumulus sau 44 giờ nuôi cấy được loại bỏ hoàn toàn tế bào cumulus, sau đó toàn bộ tế bào trứng được cố định mẫu và nhuộm Aceto-Orcein theo qui trình của Nguyễn Ngọc Tấn và ctv (2019b). Hình thái nhân của tế bào trứng được quan sát dưới kính hiển vi quang học. Dưới kính hiển vi, quan sát được một số trạng thái điển hình: túi mầm (GV-Germinal Vesicle): quan sát được hình vòng nhẫn; giai đoạn GVBD (Germinal Vesicle Break Down): nhiễm sắc thể dạng sợi mảnh thoát ra khỏi màng nhân đang tiêu biến; MI (Metaphase I): nhiễm sắc thể ở kỳ giữa giảm phân 1 (đóng xoắn cực đại thể hiện thành một đĩa nhân); MII (Metaphase II) nhiễm sắc thể đồng dạng sắp xếp trên mặt phẳng xích đạo của thoi vô sắc ở giai đoạn gian kỳ của giảm phân II và xuất hiện thể cực thứ nhất. Tế bào trứng được đánh giá thành thực nhân là khi quan sát được nhiễm sắc thể ở giai đoạn MII.

2.2.3. Đánh giá ảnh hưởng việc sử dụng dịch nang noãn (FF), hCG đến sự thành thực nhân tế bào trứng heo

Phức hợp COCs được nuôi cấy trong vi giọt (100µl) của ba môi trường khác nhau: môi trường 1 (MT1): TCM199 + BSA + Kháng sinh, môi trường 2 (MT2): TCM199 + BSA + Kháng sinh + FF, môi trường 3 (MT3): TCM199 + BSA + Kháng sinh + FF + hCG trong 22 giờ đầu tiên, sau đó tiến hành thay môi trường nuôi cấy không chứa hCG và tiếp tục nuôi đến 44 giờ ở điều kiện 39°C, 5% CO₂. Đánh giá tỷ lệ thành thực nhân theo phương pháp nhuộm Aceto-Orcein và thí nghiệm được thực hiện với 7 lần lặp lại.

2.2.4. Đánh giá ảnh hưởng của nồng độ FF khác nhau đến sự thành thực nhân của tế bào trứng heo

Phức hợp COCs được nuôi cấy trong vi giọt (100µl) của môi trường nuôi cấy (TCM199 + BSA + Kháng sinh + hCG) và bổ sung FF với các nồng độ khác nhau (0, 5, 10 và 15%). Sau

44 giờ nuôi cấy, phức hợp COCs được loại bỏ lớp tế bào cumulus và đánh giá tỷ lệ thành thực nhân theo phương pháp nhuộm Aceto-Orcein và thí nghiệm được thực hiện với 7 lần lặp lại.

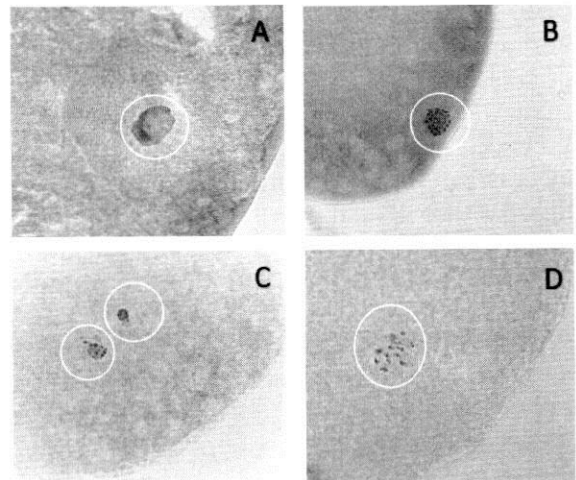
2.3. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý theo phương pháp thống kê mô tả và phân tích phương sai một yếu tố (ANOVA), sau đó trắc nghiệm Tukey được sử dụng để so sánh phân hạng. Các số liệu được trình bày dưới dạng Mean±SE từ ít nhất 3 lần lặp lại. Các giá trị % được chuyển về dạng Arcsin trước khi thực hiện ANOVA.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của FF và hCG đến sự thành thực nhân tế bào trứng heo

Sau 44 giờ nuôi cấy, tế bào trứng đã loại bỏ tế bào cumulus được nhuộm với Aceto-Orcein và quan sát dưới kính hiển vi quang học để phân loại dựa vào hình thái nhân tế bào, hình ảnh đại diện cho các giai đoạn của nhân được trình bày ở Hình 2 và tỷ lệ thành thực nhân của tế bào trứng được tổng hợp và trình bày ở Bảng 1.



Hình 2. Các trạng thái nhân tế bào trứng sau khi nhuộm Aceto-Orcein

(A): GV (Germinal Vesicle), (B): giai đoạn MI, (C): giai đoạn MII, (D): thoái hóa. Độ phóng đại 1.000 lần.

Bảng 1. Ảnh hưởng của FF và hCG đến sự thành thực nhân tế bào trứng heo

Môi trường nuôi cấy	Số tế bào trứng nuôi cấy	Tỷ lệ tế bào trứng đạt đến các giai đoạn khác nhau của nhân (%)			
		n (GV/GVBD)	n (MI)	n (MII)	n (Thoái hóa)
MT1	140	55 (39,3 ^a ±4,6)	45 (32,1 ^a ±3,1)	34 (24,3 ^c ±2,5)	6 (4,3±2,3)
MT2	140	48 (34,3 ^{ab} ±3,5)	31 (22,1 ^{ab} ±5,1)	57 (40,7 ^b ±2,8)	4 (2,9±1,5)
MT3	140	31 (22,1 ^b ±3,4)	14 (10,0 ^b ±3,1)	92 (65,7 ^a ±2,3)	3 (2,1±1,5)

Trong cùng một cột, số liệu mang các chữ cái khác nhau thì sai khác có ý nghĩa ($P < 0,05$).

Qua số liệu Bảng 1 cho thấy, việc bổ sung FF và hCG vào môi trường nuôi cấy có tác động tích cực đến tỷ lệ thành thực nhân của tế bào trứng heo, cụ thể là nhóm COCs được nuôi cấy trong môi trường bổ sung cả FF và hCG (MT3) đạt tỷ lệ thành thực nhân (65,7%) cao hơn đáng kể ($P < 0,05$) so với nhóm COCs được nuôi cấy trong môi trường chỉ bổ sung FF (MT2) là 40,7% và đạt thấp nhất là 24,3% ở nhóm COCs nuôi cấy trong môi trường không bổ sung cả FF và hCG (MT1). Điều này có thể do các hoạt chất sinh học có trong FF kết hợp với hormone hCG giúp cải thiện khả năng thành thực nhân của tế bào trứng, giảm tỷ lệ tế bào trứng dùng giảm phân ở MI hay không kích hoạt được quá trình giảm phân nên vẫn tồn tại ở GV, đặc biệt ở MT3. Chúng tỏ rằng sự hiện diện của FF và hCG giúp làm tăng khả

năng thành thực nhân của tế bào trứng heo.

Kết quả này tương tự với nghiên cứu trên tế bào trứng bò (Arredondo và ctv, 1996) và trên ngựa (Bøgh và ctv, 2002) khi bổ sung dịch nang noãn vào môi trường nuôi cấy thì tỷ lệ thành thực của tế bào trứng tăng đáng kể.

3.2. Ảnh hưởng của FF ở các nồng độ khác nhau đến sự thành thực nhân của tế bào trứng heo

Từ kết quả thu được ở nội dung 1, môi trường nuôi cấy bao gồm: TCM199 + BSA + Kháng sinh + FF + hCG được lựa chọn để tiến hành đánh giá ảnh hưởng của nồng độ FF khác nhau bổ sung vào môi trường nuôi cấy đến tỷ lệ thành thực nhân của tế bào trứng heo. Kết quả sau khi nhuộm Aceto-Orcein, quan sát được dưới kính hiển vi được ghi nhận và trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ FF đến sự thành thực nhân của tế bào trứng heo

Nồng độ FF (%)	Số tế bào trứng nuôi cấy	Tỷ lệ tế bào trứng đạt đến các giai đoạn khác nhau của nhân (%)			
		n (GV/GVBD)	n (MI)	n (MII)	n (Thoái hóa)
0	140	44 (31,4 ^a ±3,6)	48 (34,3 ^a ±3,0)	42 (30,0 ^c ±3,1)	6 (4,3 ^a ±1,3)
5	140	35 (25,0 ^{ab} ±3,5)	36(25,7 ^{ab} ±3,0)	64 (45,7 ^b ±2,0)	5 (3,6 ^a ±0,9)
10	140	33 (23,6 ^{ab} ±2,8)	20 (14,3 ^b ±2,8)	85 (60,7 ^a ±2,3)	2 (1,4 ^b ±0,9)
15	140	19 (13,6 ^b ±2,1)	22 (15,7 ^b ±2,8)	98 (70,0 ^a ±2,7)	1 (0,7 ^b ±0,7)

Từ kết quả Bảng 2 cho thấy, việc bổ sung FF vào môi trường nuôi cấy ở các nồng độ khác nhau đã có tác động tích cực đến tỷ lệ thành thực nhân của tế bào trứng. Tỷ lệ thành thực nhân (MII) đạt cao nhất (70%) khi COCs được nuôi trong môi trường bổ sung FF ở nồng độ 15%, tiếp đến là nhóm COCs được nuôi trong môi trường bổ sung FF ở nồng độ 10% (60,7%), 45,7% ở nhóm COCs được nuôi

trong môi trường bổ sung FF ở nồng độ 5% và 30% ở nhóm 0% FF. Sự khác biệt là có ý nghĩa ($P < 0,05$) được tìm thấy ở nhóm COCs nuôi cấy trong môi trường có bổ sung FF so với không bổ sung, nhưng sự khác biệt về tỷ lệ MII giữa nhóm COCs nuôi cấy có bổ sung 10 và 15% FF không có ý nghĩa ($P > 0,05$). Điều này cũng có thể giải thích rằng, các hoạt chất có trong dịch nang noãn có hoạt tính sinh học và có

ngưỡng tác động sinh học nhất định đến quá trình thành thực nhân của tế bào trứng. Cũng chính vì điều này, nồng độ FF 10% được xem là nồng độ cơ bản được khuyến khích bổ sung vào môi trường nuôi cấy tế bào trứng *in vitro*.

Bên cạnh đó, những nghiên cứu gần đây cho thấy FF thúc đẩy sự thành thực tế bào chất của tế bào trứng trong quá trình IVM và cho rằng vai trò chính của FF là cung cấp sự bảo vệ chống lại oxy hóa (Gruppen và Armstrong, 2010). Một số thành phần có thể có trong FF, bao gồm axit amin (Hong và Lee, 2007), chất hoạt hóa plasminogen và plasmin đã được phát hiện có tác dụng tích cực đối với sự thành thực của tế bào trứng heo trong điều kiện *in vitro*, đặc biệt là thành thực về tế bào chất (Papanikolaou và ctv, 2008).

4. KẾT LUẬN

Dịch nang noãn và hCG đóng vai trò quan trọng trong việc thúc đẩy sự thành thực nhân của tế bào trứng heo, đặc biệt là ở nồng độ 10% của dịch nang noãn được bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Việc tiếp tục các nghiên cứu tiếp theo để làm sáng tỏ ảnh hưởng của dịch nang noãn, hCG đến sự thành thực tế bào chất và phát triển phôi sau đó là cần thiết.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Appeltant R., Somfal T., Maes D., Soom A.V. and Kikuchi K. (2016). Porcine oocyte maturation *in vitro*: role of cAMP and oocyte-secreted factors – A practical approach. *J. Rep. Dev.*, **62**(5): 439-49.
- Arredoondo A.R., Seidel G.E. and Notes Jr.A. (1996). Effect of follicular fluid during *in vitro* maturation of bovine oocytes on *in vitro* fertilization and early embryonic development. *Bio. Rep.*, **55**(5): 1012-16.
- Bogh I., Bézard J., Duchamp G., Baltsen M., Gerard N., Daeles P. and Greve T. (2002). Pure preovulatory follicular fluid promotes *in vitro* maturation of *in vivo* aspirated equine oocytes. *Theriogenology*, **57**: 1765-79.
- Davichi N.D., Kohram H. and Zainoaldini S. (2012). Cumulus cell layers as a critical factor in meiotic competence and cumulus expansion of ovine oocytes. *Small Rum. Res.*, **102**: 37-42.
- Gruppen C. and Armstrong D. (2010). Relationship between cumulus cell apoptosis, progesterone production and porcine oocyte developmental competence: temporal effect of follicular fluid during IVM. *Rep. Fer. Dev.*, **22**: 1100-09.
- Hirao Y., Naruse K., Kaneda M., Somfai T., Iga K., Shimizu M., Akagi S., Cao K., Kono T. and Nagai T. (2013). Prooduction of fertile offspring from oocytes grown *in vitro* by nuclear transfer in cattle. *Bio. Rep.*, **89**: 57.
- Hong J. and Lee E. (2007). Intrafollicular amino acid concentration and effect of amino acids in a defined maturation medium on porcine oocyte maturation, fertilization and preimplantation development. *Theriogenology*, **68**: 728-35.
- Lin T., Zhang J.Y., Diao Y.F. and Kang J.W. (2015). Effect of sorbitol on porcine oocyte maturation and embryo development *in vitro*. *Cambridge Uni. Press*, **23**(2): 297-06.
- Luo H., Kimura K., Aoki M. and Hirako M. (2002). Effect of Vascular Endothelial Growth Factor on maturation, fertilization and development competence of bovine oocytes. *Theriogenology*, **64**(9): 803-06.
- Mochida N., Akatani A.H., Saka K., Ogino M., Hosoda Y., Wada R., Sawai H. and Shibahara H. (2013). Live births from isolated primary/early secondary follicles following a multistep culture without organ culture in mice. *Rep.*, **146**: 37-47.
- Papanikolaou T., Amiridis G., Dimitriadis I., Vainas E. and Rekkas C. (2008). Effect of plasmin, plasminogen activators and a plasmin inhibitor on bovine *in vitro* embryo production. *Reproduction, Fer. Dev.*, **20**: 320-27.
- Takasi H., Iwata H., Sato D., Monji Y. and Kuwayama T. (2013). Estradiol has a major role in antrum formation of porcine preantral follicles cultured *in vitro*. *Theriogenology*, **79**: 809-14.
- Nguyễn Ngọc Tấn, Trần Hồ Ái Ngân và Phạm Thị Ngọc Trúc (2019b). Ảnh hưởng của đồng nuôi cấy phức hợp tế bào trứng heo có chất lượng khác nhau đến khả năng thành thực nhân trong điều kiện *in vitro*. *Tạp chí KHKT Chăn nuôi*, **251**: 65-70.
- Nguyễn Ngọc Tấn, Trần Hồ Ái Ngân và Phan Hữu Hương Trinh (2019a). Ảnh hưởng của tỷ lệ tinh trùng trên tế bào trứng đến thụ tinh đa tinh trùng ở tế bào trứng heo trong thụ tinh vi giọt. *Tạp chí KHKT Chăn nuôi*, **243**: 57-72.
- Wang Z.G., Yu S.D. and Xu Z.X. (2007). Effect of collection methods on recovery efficiency, maturation rate and subsequent embryonic developmental competence of oocytes in Holstein cow. *Asian Aust. J. Ani.*, **20**: 496-00.
- Wu J., Emery B.R. and Carrell D.T. (2011). *In vitro* growth, maturation, fertilization and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. *Bio. Rep.*, **64**: 375-81.