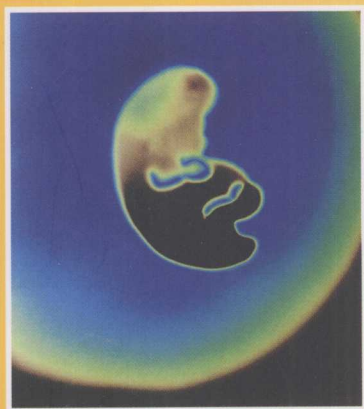




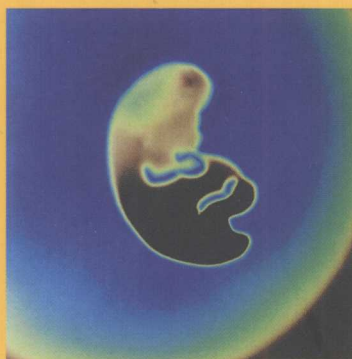
王利红 张兆香 艾白媛 王 哲 主编

FUZHUSHENGZHI
SHIYANSHI
JISHUSHOUCE

辅助生殖实验室 技术手册



济南出版社



FUZHUSHENGZHI
SHIYANSHIJISHUSHOUCE

责任编辑/韩宝娟 封面设计/薛 涵

ISBN 978-7-80710-528-2



9 787807 105282 >

定价：30.00元

辅助生殖实验室技术手册

主 编 王利红 张兆香 艾白媛 王 哲

济南出版社

图书在版编目(CIP)数据

辅助生殖实验室技术手册/王利红等主编. —济南:
济南出版社, 2007. 11

ISBN 978 - 7 - 80710 - 528 - 2

I. 辅... II. 王... III. 试管婴儿—技术手册 IV. R321 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 164946 号

责任编辑 韩宝娟

封面设计 薛 涵

出版发行 济南出版社

地 址 山东省济南市经七路 251 号

邮 编 250001

网 址 www.jnpub.com

印 刷 山东省恒兴实业总公司印刷厂

版 次 2007 年 11 月第 1 版

印 次 2007 年 11 月第 1 次印刷

开 本 787 × 1092 毫米 1/16

印 张 14.25

字 数 330 千字

定 价 30.00 元

书 号 ISBN 978 - 7 - 80710 - 528 - 2

编委会名单

主 审 连 方

主 编 王利红 张兆香 艾白媛 王 哲

副主编 孙振高 马凤梅 鞠红梅 孙晓霞

宋文杰 刘延荷 孟 茜

编 者 (以姓氏笔画为序)

马凤梅 王 珊 王 哲 王 萍 王利红

艾白媛 孙振高 孙晓霞 孙雪梅 刘延荷

刘海平 牟善芳 孟 茜 宋文杰 陈 曦

张兆香 张亚杰 杨慧君 钟景琦 胡京美

徐 娜 鹿 群 童先宏 谭迎春 鞠红梅

马凤梅	山东中医药大学附属医院
王 珊	山东省立医院
王 哲	山东中医药大学附属医院
王 萍	山东中医药大学附属医院
王利红	山东中医药大学附属医院
艾白媛	山东中医药大学附属医院
孙振高	山东中医药大学附属医院
孙晓霞	山东中医药大学附属医院
孙雪梅	山东中医药大学附属医院
刘延荷	山东中医药大学附属医院
刘海平	济南解放军总医院
牟善芳	山东中医药大学附属医院
孟 茜	山东中医药大学附属医院
宋文杰	武警山东省边防总队医院
陈 曦	北京大学人民医院
张兆香	山东科技大学
张亚杰	济南市妇幼保健院
杨慧君	山东省立医院
钟景琦	山东中医药大学附属医院
胡京美	山东省立医院
徐 娜	山东中医药大学附属医院
鹿 群	北京大学人民医院
童先宏	安徽省立医院
谭迎春	山东省千佛山医院
鞠红梅	山东中医药大学附属医院

前 言

在我国生殖医学研究与临床工作蓬勃发展的当今形势下,与其密切相关的参考书与教材层出不穷。辅助生殖实验室技术是整条助孕链上的中间环节,也是助孕技术的核心部分,但在众多的参考书中尚无专门介绍此部分内容的专著。编写此书的目的是为从事生殖医学工作的实验室工作人员以及研究人员提供实用的、较系统规范的生殖医学实验室基础知识与技术参考。此书既是一部介绍当今生殖医学实验室技术的参考书,同时也介绍了人类配子、胚胎生成发育的基础理论知识。本书共分 15 章,第一篇辅助生殖实验室技术,包括卵母细胞的发生、发育及成熟;精子的发生及调节;受精与胚胎发育;精液分析及精子功能检测;人工授精技术;体外受精—胚胎移植;卵胞浆内单精子显微注射;辅助孵化;胚胎及配子冷冻保存;未成熟卵母细胞体外培养;胚胎干细胞。第二篇辅助生殖实验室的建设与管理,包括辅助生殖实验室的建设;辅助生殖实验室的管理。第三篇现代辅助生殖技术的伦理调控,包括辅助生殖技术相关伦理学问题;加强伦理调控与生殖医学伦理委员会的建设。本书的编者们皆以认真负责的态度对待每一章、每一节的撰写。然而,生殖医学的发展十分迅速,本书难免有不妥之处,恳切希望广大读者及同行不吝赐教,批评指正。

在本书出版之际,由衷感谢北京大学人民医院陈曦、鹿群;安徽省立医院童先宏;山东省立医院胡京美、杨慧君等编者对本书编写工作给予的热情鼓励与支持。

王利红

2007 年 10 月于山东济南

目 录

第一篇 辅助生殖实验室技术

第一章 卵母细胞的发生、发育	基本条件	(71)
及成熟	第一节 人工授精前的准备	
第一节 卵母细胞的发生与	工作	(71)
早期生长	第二节 人工授精的临床步骤	(72)
(3)	第三节 人工授精中精液的	
第二节 卵泡发育及卵母细胞	处理方法	(73)
成熟	第四节 人工授精实验室所需仪器	
(5)	设备及耗材	(77)
第三节 卵泡发育时的激素生成和	第五节 异常情况的处理	(78)
分泌功能	第六节 精液处理中需要注意的	
(10)	几个问题	(79)
第四节 卵泡发育的调控	第七节 人工授精成功率的	
(12)	影响因素	(80)
第二章 精子的发生及调节	第八节 人工授精的并发症	(80)
第一节 精子的发生	第六章 体外受精—胚胎移植	(82)
第二节 精子发生的调节	第一节 IVF-ET 的适应症及	
(31)	禁忌症	(82)
第三章 受精与胚胎发育	第二节 IVF-ET 的术前准备	(83)
第一节 受精	第三节 培养前的准备工作	(83)
第二节 胚胎发育	第四节 卵母细胞的获取	
(48)	与处理	(86)
第四章 精液分析及精子	第五节 精子优选	(87)
功能检测	第六节 体外受精	(88)
(56)	第七节 胚胎体外培养	(91)
第一节 精液常规分析	第八节 胚胎移植	(95)
(56)	第九节 配子移植技术	(95)
第二节 精液细胞形态检查	第七章 卵胞浆内单精子	
(58)		
第三节 精子的功能检查		
(61)		
第四节 精液感染指标的检测		
(66)		
第五节 精子染色体的制备与		
核型分析		
(67)		
第六节 展望		
(68)		
第五章 人工授精技术		
第一节 人工授精的分类		
(70)		
第二节 接受人工授精所需具备的		

显微注射	(98)	成熟过程和机制	(130)
第一节 ICSI 概述	(98)	第二节 卵母细胞成熟中激素及 生长因子的调控	(131)
第二节 ICSI 的适应症 与禁忌症	(98)	第三节 影响未成熟卵体外 成熟的因素	(133)
第三节 仪器设备与试剂耗材	(99)	第四节 IVM 的临床方案	(134)
第四节 显微操作过程	(100)	第五节 获取不成熟卵的 临床操作过程	(135)
第五节 ICSI 成功的 影响因素	(104)	第六节 未成熟卵体外培养的 实验室技术	(136)
第六节 ICSI 治疗的风险	(106)	第七节 未成熟卵体外培养 存在的问题	(141)
第七节 胚胎活检	(107)	第八节 IVM 技术的安全性 及应用前景	(141)
第八节 核移植	(110)	第十一章 胚胎干细胞	(145)
第八章 辅助孵化	(112)	第一节 胚胎干细胞的概述	(145)
第一节 辅助孵化的指征	(112)	第二节 胚胎干细胞建系	(146)
第二节 辅助孵化方法	(113)	第三节 胚胎干细胞保持自我更新、 多能性的机制	(155)
第三节 辅助孵化在辅助生殖 其他方面的应用	(116)	第四节 ES 细胞体外诱导分化	(157)
第四节 辅助孵化的 不良反应	(117)	第五节 胚胎干细胞的应用	(160)
第九章 胚胎及配子冷冻保存	(119)	第六节 胚胎干细胞与 治疗性克隆	(161)
第一节 冷冻概述	(119)	第七节 胚胎干细胞的伦理学 问题	(161)
第二节 胚胎冷冻	(121)		
第三节 卵母细胞冷冻	(124)		
第四节 精子冷冻	(127)		
第十章 未成熟卵母细胞 体外培养	(130)		
第一节 卵泡及卵母细胞的			

第二篇 辅助生殖实验室的建设与管理

第十二章 辅助生殖实验室的建设	(167)	第四节 实验室内各种 规章制度的建立	(177)
第一节 实验室的选址、设计和 装修	(167)	第五节 人员培训	(178)
第二节 实验室设备	(171)	第十三章 辅助生殖实验室的管理	(181)
第三节 实验室耗材	(176)	第一节 概 述	(181)

第二节 实验室质控的基本内容	
.....	(181)

第三节 实验室规范化	
管理	(186)

第三篇 现代辅助生殖技术的伦理调控

第十四章 辅助生殖技术相关伦理学	
问题	(195)
第一节 ART 带来的伦理问题	
.....	(195)
第二节 实现辅助生殖技术	
公正性的策略	(198)

第十五章 加强伦理调控与生殖医学	
伦理委员会的建设 ...	(204)
第一节 加强 ART 的伦理调控	
.....	(204)
第二节 加强生殖医学伦理	
委员会的建设	(206)

第一篇 辅助生殖实验室技术

第一章 卵母细胞的发生、发育及成熟

目前认为,卵巢中卵母细胞的贮备与三个因素有关:①达到生殖脊的原始生殖细胞的数目。②卵原细胞的有丝分裂活性。③卵原细胞和卵母细胞耗损,特别是到达第一次减数分裂前期的数目很关键。减数分裂一开始,有丝分裂就停止,人类出生前减数分裂已开始,所以出生时卵母细胞贮备池已经确定,以后随着时间流逝而减少,直至年老时耗竭。

人类卵泡形成于胎儿期4个月左右,出生时有6 000 000~7 000 000个静止卵泡,随后卵泡陆续离开静止池,或凋亡或进入生长阶段。卵泡按其发育的不同阶段分为原始卵泡、初级卵泡、次级卵泡、窦卵泡和排卵前卵泡。卵泡的生长发育受到下丘脑—垂体—卵巢性腺轴和轴外调节。促性腺激素特别是FSH和LH直接调节卵泡的生长发育和激素分泌,某些生长因子和细胞因子通过直接和间接途径起作用。

原始卵泡处于静止状态,卵母细胞处于第一次减数分裂前期。原始卵泡转变

成初级卵泡,开始第一次募集,主要受卵巢局部的因子来调控,FSH作用有限。因为人类卵泡生长达到5mm之前,颗粒细胞表面不表达FSH受体。

卵泡进入生长阶段后,卵母细胞体积增大,颗粒细胞增殖,透明带形成,内层卵泡膜细胞增殖并分化。卵泡直径达5~8mm时,优势卵泡出现并继续发育,而同簇其他卵泡闭锁,此过程为选择。优势卵泡的选择主要由FSH控制,FSH和LH在卵泡晚期发育中起关键作用。LH作用于卵泡膜细胞,刺激雄激素包括雄烯二酮和睾酮合成,FSH作用于颗粒细胞,激活芳香化酶活性,雄烯二酮转化为雌二醇。FSH受到颗粒细胞合成的雌二醇和抑制素的负反馈调控。

优势卵泡的特征是颗粒细胞产生足够的类固醇特别是雌二醇,并且具备丰富的LH受体,同时产生TGF类因子,激活A,抑制其他卵泡生长。随着抑制素的增多,FSH分泌受到抑制,其他卵泡在FSH不足的环境中不能进一步发育而闭锁。

第一节 卵母细胞的发生与早期生长

一、卵巢的形成

在胚胎着床的第4周,原始生殖细胞通过伪足运动迁移到生殖嵴,生殖嵴分化成卵巢。卵巢表面被覆有单层扁平或立方上皮,称为表面上皮(Superficial Epithelium),与腹膜脏层的间皮相延续。上皮下方为薄层致密结缔组织,称白膜(Tunica Albuginea)。卵巢实质的周围部称皮质,

中央部称髓质,两者间无明显分界。皮质较厚,由发育不同阶段的卵泡和结缔组织构成。髓质范围较小,由疏松结缔组织构成,其中含较多弹性纤维和较大血管。

二、卵母细胞的发生、发育

卵母细胞发生始于原始生殖细胞(Primordial Germ Cell,PGCs)的形成。在妊娠的第四周,原始生殖细胞首先出现在卵

黄囊尾侧壁,在妊娠第5周通过伪足变形运动缓慢迁移到生殖嵴表面,此时PGCs发育为卵原细胞(Oogonia)。在接下来的2周(妊娠第5~7周),原始生殖腺的中央部分不再膨胀,生殖嵴表面间叶细胞上皮不断增生,卵原细胞增长,生殖嵴明显隆起。在妊娠第7周末,卵原细胞数量约10 000个,这时没有发生减数分裂(Meiosis)也没有卵原细胞闭锁(Atresia),故称之为“未分化期”。到妊娠第8周,持续的有丝分裂(Mitosis)使卵原细胞数量达到60 000个,从此,卵原细胞在有丝分裂的基础上获得减数分裂及闭锁的能力。在妊娠20周时,卵原细胞在有丝分裂、减数分裂及闭锁的过程中达到平衡,卵原细胞的数量增加了10~20倍,达到6 000 000~7 000 000个,卵原细胞的数量从此终生不再增加。其中有2/3的生殖细胞处于第一次减数分裂过程中,此时的生殖细胞称为初级卵母细胞(Primary Oocyte)。减数分裂使卵原细胞暂时不闭锁,周围的颗粒细胞生长形成始基卵泡(Primordial Follicle),没有发生减数分裂的卵原细胞发生闭锁。妊娠7个月后卵原细胞有丝分裂完全停止,故女胎出生时卵巢中已不存在卵原细胞。

在妊娠第5周,卵原细胞开始减数分裂,并停止在双线期,此时卵母细胞以生殖泡(Germinal Vesicle, GV)的形成作为特征(图1-1)。生殖泡一直要持续到排卵前发生生殖泡裂解(Germinal Vesicle Breakdown, GVBD)才消失。为什么初级卵母细胞在第一次减数分裂的前期——双线期(Diplotene)停止发育,目前认为与颗粒细胞分泌的某些物质抑制卵母细胞减数分裂的进行有关,如卵母细胞成熟抑制物(Oocyte Maturation Inhibitor, OMI)、次黄嘌呤、环磷酸腺苷(cAMP)引起相应关键酶

活性改变。当一个卵原细胞经过2次减数分裂后,由原来的46条染色体的双倍体细胞形成一个23条染色单体的卵母细胞和三个极体。

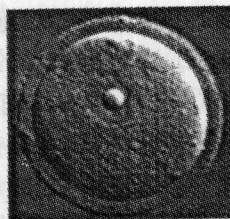


图1-1 具有生殖泡的初级卵母细胞

三、卵母细胞及其周围物质

卵泡由卵母细胞(Oocyte)、颗粒细胞和卵泡膜细胞组成。卵泡发育是个连续的生长过程,其结构发生一系列变化,一般可分为原始卵泡、初级卵泡、次级卵泡、窦卵泡与排卵前卵泡五个阶段。当卵泡生成为次级卵泡时,颗粒细胞增至6~12层,细胞间出现些不规则的腔隙,并逐渐合并成一个半月形的腔,称为卵泡腔(Follicular Antrum),腔内充满卵泡液。卵泡液是由卵泡细胞分泌和卵泡膜血管渗出液组成,卵泡液除含有一般营养成分外,还有卵泡分泌的类固醇激素和多种生物活性物质,对卵泡的发育成熟有重要影响。随着卵泡液的增多及卵泡腔扩大,卵母细胞居于卵泡的一侧,并与其周围的颗粒细胞一起突向卵泡腔,形成卵丘(Cumulus Oophorus)。此时初级卵母细胞直径可达125~150 μ m。紧贴透明带的一层柱状颗粒细胞呈放射状排列,称放射冠(Corona Radiata)。分布在卵泡腔周边的卵泡细胞较小,构成卵泡壁,称为颗粒层(Stratum Granulosum)。在卵泡生长过程中,卵泡膜分化为内、外两层。内膜层(Theca Interna)含有较多的多边形或梭形的膜细胞(Theca Cell)及丰富的毛细血管,膜细胞具有分泌类固醇激素细胞的结构特征。外

膜层(Theca Externa)主要由结缔组织构成,胶原纤维较多,并含有平滑肌纤维。

1. 卵母细胞

生长的卵母细胞表达若干成功受精和植入前发育所必需的基因,包括与透明带形成有关的基因,透明带是卵母细胞周围的细胞外基质,保护卵泡内生殖细胞的发育、输卵管内已排的卵母细胞以及卵裂期胚胎。透明带作为最初与精子接触的部位,在受精之后成为屏障防止多精受精。有3个基因编码 ZP_1 、 ZP_2 、 ZP_3 (Zona Protein),这些蛋白是透明带主要的硫酸糖蛋白。 ZP_2 和 ZP_3 蛋白多聚体形成丝状体,通过 ZP_1 相互连结。在小鼠, ZP_3 被认为是主要的精子受体, ZP_2 是次要受体,在人类除 ZP_3 外还需其他ZP糖蛋白的参与。受精后,皮层颗粒蛋白酶修饰透明带,裂解 ZP_2 。这种修饰是防止多精子结合受精,还是附带现象还有待确定。

卵母细胞对于卵泡功能起重要作用,它的存在与卵泡的存活与发育有关,这一观点由以下实验得以证实:卵泡存活依赖于有活性的生殖细胞存在,将卵母细胞从窦状卵泡中移除后,随后出现黄体化,提示卵母细胞能产生抑制颗粒细胞终末分化的因子。将小鼠次级卵泡中中等大小的卵母细胞移植转移到始基卵泡中,在次级卵母细胞存在的情况下,该始基卵泡发育的速度加倍。

2. 颗粒细胞

颗粒细胞被认为是起源于卵巢表面上皮样间皮或者卵巢网。包绕同一个卵母细胞的颗粒细胞群为寡克隆来源,3~5

个原始细胞即可产生成熟卵泡内全部的颗粒细胞。颗粒细胞没有直接的血供;有一个相对的血—卵泡屏障,是从血管化的膜内层分离出来的基层,可以限制白细胞和大分子量物质的进入。缺乏血供的颗粒细胞需要与邻近颗粒细胞和卵母细胞之间的密切联系。颗粒细胞通过广泛的缝隙连接网络互相连接,有效地结合成一个整体的、有功能的合胞体。此外,颗粒细胞胞质突起延伸并穿过透明带,与卵母细胞膜之间形成缝隙连接。颗粒细胞产生的环磷酸腺苷(cAMP),可能是经由缝隙连接进入卵母细胞,是使卵母细胞保持在成熟停滞状态的因子之一。

排卵前颗粒细胞产生的主要甾体激素是雌激素。雌激素的合成需要邻近膜细胞的合作,膜细胞产生参加芳香化反应的直接前体。该过程由作用于膜成分的LH直接控制,并由作用于颗粒细胞的FSH调控。颗粒细胞由于在卵泡内位置不同,呈现不同的表型,壁颗粒细胞、窦颗粒细胞、卵丘颗粒细胞相互区分的特征很可能是由它们与卵母细胞和卵泡膜细胞接近的程度,以及它们产生的旁分泌物质所决定的。窦状卵泡内的壁颗粒细胞产生甾体激素的活性最大,靠近窦腔的颗粒细胞甾体生成酶表达最少,而在那些位于中间区域的颗粒细胞有丝分裂活性比壁颗粒细胞、窦颗粒细胞高。卵丘细胞与卵母细胞在排卵时一起释放,它不表达芳香化酶,当受到前列腺素激发排卵刺激时,这些细胞活跃地产生细胞外基质,包括透明质酸、蛋白多糖和蛋白多糖结合蛋白等。

第二节 卵泡发育及卵母细胞成熟

卵泡由生殖细胞、周围的体细胞(包括颗粒细胞和卵泡膜细胞)组成,卵泡的

生长发育与这三种细胞的生长发育及相互作用密切相关。其生长发育过程中大致

经过原始卵泡、生长卵泡和成熟卵泡三个阶段。

一、原始卵泡—静止卵泡的发育及生长

妊娠第5周,卵原细胞开始第一次减数分裂形成初级卵母细胞及周围包绕单层前颗粒细胞(Preggranulosa Cells)共同组成始基卵泡,它是卵细胞储备的唯一形式,亦是卵巢基本功能单位。人类静止卵泡的发育是非促性腺激素依赖的,受遗传因素和局部的各种调节因子影响。Gougeon对人类卵巢静止卵泡(Resting Follicles)分级(图1-2)如下:

1. 原始卵泡(Primordial Follicles)

原始卵泡直径0.03~0.06mm,含有一个初级卵母细胞,周围包绕单层扁平的前颗粒细胞。

2. 中间卵泡(Intermediary Follicles)

中间卵泡直径0.03~0.06mm,含有一个初级卵母细胞,周围交替包绕单层扁平 and 单层柱状颗粒细胞。

3. 初级卵泡(Primary Follicles)

初级卵泡直径大于0.06mm,含有一个卵母细胞,周围交替包绕单层柱状颗粒细胞。

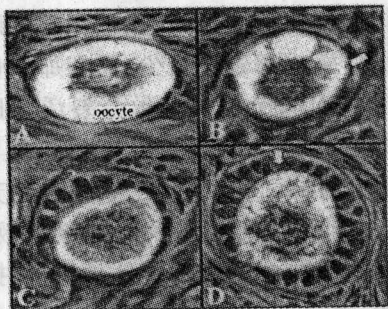


图1-2 静止期卵泡

(A、B 原始卵泡;C 中间卵泡;D 初级卵泡)

二、早期生长卵泡

当始基卵泡脱离静止状态后,卵泡生长开始,这种活动从宫内第5~6个月开

始,持续至绝经。人们将它们分为次级卵泡、窦前卵泡、早期窦卵泡及选择卵泡四个时期。

此期卵泡的主要结构变化是:①卵泡直径逐渐增大,未出现液腔,初级卵母细胞体积增大,核也变大呈泡状。②颗粒细胞由扁平变成立方或柱状,进而增殖为多层。③初级卵母细胞与颗粒细胞间出现折光性强的嗜酸性膜,称为透明带(Zona Pellucida)。目前认为至少由3种糖蛋白构成,即 ZP_1 、 ZP_2 、 ZP_3 ,是由初级卵母细胞和颗粒细胞共同分泌的。此时开始表达促卵泡生成素(FSH)、雌激素(E_2)、孕激素(P)、雄激素(T)受体。颗粒细胞和卵母细胞间出现缝隙连接(Gap Junction),保持细胞间营养及小分子物质交换、信息传递。

卵母细胞的分化和生长是次级卵泡生长期的重要组成部分。生长中的卵母细胞是代谢活跃的细胞,胚胎植入前的早期阶段,合成支持生长和发育的mRNA和蛋白的过程持续进行着。事实上,卵母细胞将给发育中的胚胎提供大部分的胞质和胞核成分。卵母细胞与周围颗粒细胞跨透明带突起直接连接,即缝隙连接,通过双向转运营养、生长因子和其他分子支持卵母细胞生长。卵母细胞的形态改变在生长期发生,其中包括通过活跃的生产、装配以及分泌成分蛋白,形成精微的透明带;增加几种胞质细胞器的数量,尤其是线粒体,估计其数量在充分生长的人类卵母细胞内大约为50万个;细胞器的分布也发生改变,包括线粒体、内质网、高尔基复合体在胞核周围邻近区域的聚集。生长过程中卵泡逐渐移向皮质深部。生长卵泡的结构和大小差别很大,主要是卵母细胞长大,颗粒细胞和卵泡周围结缔组织增生。

在生长期,卵母细胞具备了使减数分裂成熟的能力,获得减数分裂能力的分子基础尚未完全了解。具有减数分裂能力的卵母细胞具有一定的特性,包括细胞周期蛋白 p34cdc2、细胞周期蛋白 B 以及 cdc25 水平的升高。在减数分裂过程中,染色体正确的分离依赖于完善的卵泡发生和卵母细胞的生长。在年长妇女卵巢中,这些过程可能会遭到损害,导致染色体不分离的差错和胚胎染色体的非整倍性。

尽管基因组印迹的再建直到胚胎发育的种植前晚期才完成,但是在卵母细胞生长期就已经开始了,该过程至少是部分地由于 DNA 甲基转移酶的作用。无论是卵母细胞还是男性生殖细胞中印迹建立的失败,均会导致母系或父系等位基因异常表达。如果全部丢失卵母细胞的母系印迹会导致形成完全性葡萄胎。除了减数分裂能力的发育,生长中的卵母细胞也开始获得支持植入前胚胎发育和发育至足月的能力,即所谓的“发育能力”。

三、窦卵泡生长期

FSH 促使卵泡从次级卵泡期过渡到窦状卵泡期,在缺乏 FSH 或者卵巢缺乏 FSH 受体的动物或者人类中罕见有窦状卵泡。次级卵泡继续发育开始并对促性腺激素敏感,从直径 0.12 ~ 0.2mm 的窦前卵泡发育成直径为 2.0mm 的窦卵泡 (Antral Follicles) 需要 60 天,颗粒细胞逐渐对 FSH 敏感,细胞增生并分泌卵泡液。卵母细胞及颗粒细胞移至卵泡的一侧,形成一个圆形隆起突入卵泡腔,称为卵丘 (Cumulus Oophorus),此时为促性腺激素依赖期。当窦卵泡直径达到 2mm 后,颗粒细胞对 FSH 敏感性增加,依赖 FSH 继续发育,直径可达 2 ~ 18mm,颗粒细胞数量增加 160

倍。此时初级卵母细胞已达最大体积,直径约 125 ~ 150 μ m,其周围包裹一层约 5 μ m 厚的透明带,紧靠透明带的一层高柱状颗粒细胞呈放射状排列,似冠状,故名放射冠 (Corona Radiata)。分布在卵泡腔周围的颗粒层细胞构成卵泡壁,在颗粒细胞层外有基层将卵泡膜细胞隔开,卵泡膜细胞具有分泌类固醇激素细胞的结构特点。从窦卵泡发育到成熟卵泡约需要 25 天的时间,后 15 天相当于月经周期的卵泡期。颗粒细胞中细胞色素 P₄₅₀ 芳香化酶被 FSH 激活,促进 E₂ 的合成及分泌, E₂ 反过来通过增加 FSH 受体,又加强 FSH 的作用,同时卵泡膜细胞分泌的雄激素也对卵泡的发育产生影响。

四、成熟卵泡

次级卵泡发育到最后阶段即为成熟卵泡 (Mature Follicle),此时卵泡体积很大,直径达 2cm 以上,占据皮质全层并突向卵巢表面,颗粒层细胞停止增殖,颗粒层变薄,卵丘根部的卵泡细胞间出现裂隙。排卵前 36 ~ 48 小时,初级卵母细胞完成第一次成熟分裂,排出第一极体 (First Polar Body),接着,次级卵母细胞迅速开始第二次成熟分裂,并停留在分裂中期。

五、排卵

成熟卵泡壁破裂,次级卵母细胞从卵巢排出的过程称为排卵 (Ovulation)。当接近周期中期时,优势卵泡释放雌激素的升高激发 LH 峰,以及一个较小幅度的 FSH 峰。这促发了减数分裂的再启动、排卵和黄素化。排卵前 LH 峰大约出现在卵泡破裂之前 36 小时。排卵前,颗粒细胞和卵母细胞发生许多关键性变化,包括抑制颗粒细胞增殖基因的转录;失去缝隙连接,从而拆散颗粒细胞和卵母细胞的电生理合