

猪卵母细胞体外成熟及电激活后发育能力的研究*

徐小明 杨春荣 胡军和 窦忠英**

西北农林科技大学 国家干细胞工程技术研究中心陕西分中心, 杨凌 712100

摘要 探讨了不同的成熟培养液及外源激素对猪卵母细胞体外成熟培养及电激活后孤雌胚胎发育能力的影响。结果表明:(1)改良 M199(mM199)组猪卵母细胞成熟率显著高于 M199 组,且这两组又较 NCSU-23 组能极显著提高卵母细胞的成熟率。(2)孕马血清(PMSG)+人绒毛膜促性腺激素(hCG)+促卵泡素(FSH)组卵母细胞成熟率略高于 FSH+促黄体素(LH)组,两者卵母细胞成熟率极显著高于尿促性腺激素(hMG)组。(3)含胎牛血清(FBS),猪卵泡液(PFF),表皮生长因子(EGF)的培养液较对照组在卵母细胞成熟率上无显著差异,但均能显著提高电激活后的卵裂率。添加 EGF 组桑囊率明显高于不添加组。但分别添加 FBS 和 PFF 组较对照组在桑囊率上均无显著差异。(4)卵丘细胞扩散与卵母细胞第一极体排出之间无直接相关性,但扩散程度好能提高电激活后的卵裂率。

关键词 猪 卵母细胞 体外成熟 电激活

相对体内成熟的卵母细胞来说,猪体外成熟的卵母细胞来源丰富,价格低廉,因而已成为体外受精、核移植研究的主流。但目前,猪卵母细胞体外成熟系统还不太完善,体外成熟培养时间较长,许多理化因素会直接或间接地影响到卵母细胞的体外成熟及后来的发育能力。在克隆胚的发育能力上,体内成熟的卵母细胞要好于体外成熟的卵母细胞,能提高克隆猪的成功率^[1-3]。如何优化猪卵母细胞体外成熟系统,使得卵母细胞核、质同步成熟,以便获得较强的发育能力,为当今亟需解决的问题^[4]。至今还很少见到有关猪卵母细胞体外成熟及电激活后发育能力系统比较的研究报道。本实验比较了不同培养液成分对猪卵母细胞体外成熟及电激活后发育能力的影响,旨在筛选出一种较为适宜的猪卵母细胞体外成熟培养系统,为进行猪体细胞核移植的研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 卵母细胞的采集和体外培养

猪卵巢保存在含有青、链霉素的生理盐水中,运输温度 33—38℃,3 h 内运回实验室。用加青、链霉素的生理盐水冲洗卵巢 3—5 次,然后抽取 2—8 mm 卵泡中的卵子置于 10 mL 离心管中,37℃ 水浴静置数分钟,待卵子沉降后,用 PVA-TL-Hepes 溶液洗 2 遍,实体显微镜下挑取胞质均匀、颗粒细胞层达 2 层以上的颗粒细胞-卵母细胞复合物(COCs),COCs 分别在 PVA-TL-Hepes 溶液和成熟培养液中洗 3 次后,在 38.5℃,100%湿度,5% CO₂ 培养箱中培养 42—44 h。实验过程及分组如下:

实验 1: COCs 分别在 M199(Gibco), mM199(含 M199, 0.1% 聚乙烯醇(PVA), 3.05 mmol/L 葡萄糖, 0.91 mmol/L 丙酮酸钠, 0.57 mmol/L 半胱氨酸)和 NCSU-23 3 种不同的培养基中培养, 3 种培养基中均添加 10 IU/mL PMSG, 10 IU/mL

2005-06-21 收稿, 2005-09-26 收修改稿

* 国家“八六三”计划(批准号: 2002AA216161)及国家自然科学基金(批准号: 30200137)资助项目

** 通讯作者, E-mail: zhongyingdou@126.com

hCG 和 2.5 IU/mL FSH(均为宁波激素制品有限公司产品)。

实验 2: 以 mM199 为基础培养基, 第一组添加 10 IU/mL PMSG, 10 IU/mL hCG 和 2.5 IU/mL FSH, 第二组添加 2.5 IU/mL FSH 和 2.5 IU/mL LH, 第三组添加 0.075 IU/mL hMG(丽宝生物化学制药有限公司)。

实验 3: 以 mM199 添加 10 IU/mL PMSG, 10 IU/mL hCG 和 2.5 IU/mL FSH 为基础培养液, 并分别添加与不添加 10% FBS (Hyclone)。

实验 4: 以 mM199 添加 10 IU/mL PMSG, 10 IU/mL hCG 和 2.5 IU/mL FSH 为基础培养液, 分别添加与不添加 10% PFF。

实验 5: 以 mM199 添加 10 IU/mL PMSG, 10 IU/mL hCG 和 2.5 IU/mL FSH 为基础培养液, 分别添加与不添加 10 ng/mL EGF。

以上实验, 每次实验至少重复 5 次。本实验所使用的试剂如不做特殊说明则均购自 Sigma 公司。

1.2 猪卵泡液的制备

用 10 mL 注射器抽吸直径 3—6 mm 卵泡中的卵泡液, 3000 r/min 离心 30 min, 0.22 μ m 微孔滤膜过滤, 分装, -20 $^{\circ}$ C 冻存。

1.3 卵母细胞核成熟的观察及电激活

卵母细胞成熟后, 观察并记录卵丘细胞扩散情况。将 COCs 转移到 0.3% 透明质酸酶溶液用移液器轻轻吹打脱去颗粒细胞, 挑选排出第一极体的卵母细胞。核成熟的卵子在融合液中平衡 5—10 min 后转入融合槽中, 使用 1 个直流脉冲, 电强强度 2.2 kV/cm, 脉冲时程 30 μ s, 电激活卵子。电激活仪器为美国 Cyto-pause 4000, 采用配套的专用融合液。电激活后立即将卵子移入含 7.5 μ g/mL 细胞松弛素 B(CB)的胚胎培养液培养 3 h, 之后转入无 CB 的胚胎培养液中培养。胚胎培养液为 NCSU-23 + 4 mg/mL 牛血清白蛋白(BSA)。

1.4 卵子激活后的体外培养

激活后的卵子移入胚胎培养液中, 在四孔板中培养, 培养条件为 38.5 $^{\circ}$ C, 100% 湿度, 5% CO₂。44—48 h 后记录卵裂数, 实验 4 和 5 在第 4 天将培养液换为 NCSU-23 + 10% FBS, 同时与猪颗粒细胞

共培养。分别在第 6 和 7 天时记录桑椹胚和囊胚数。

1.5 数据分析

用卡方(χ^2) 检验对不同实验组结果进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 培养基对猪卵母细胞体外成熟的影响

比较了 M199, mM199 和 NCSU-23 3 种不同培养基对猪卵母细胞成熟的影响, 结果显示(表 1), mM199 组猪卵母细胞成熟率显著高于 M199 组 ($p < 0.05$), 并且 mM199 组和 M199 组较 NCSU-23 组能极显著提高卵母细胞的成熟率 ($p < 0.01$)。

表 1 不同培养基对猪卵母细胞体外成熟的影响

成熟培养液	培养卵母细胞数	成熟卵母细胞数	成熟率/%
M199	191	114	59.7
mM199	198	142	71.7
NCSU-23	179	78	43.6

2.2 外源激素对猪卵母细胞体外成熟的影响

如表 2 所示, PMSG + hCG + FSH 组卵母细胞成熟率略高于 FSH + LH 组, 二组卵母细胞成熟率极显著高于 hMG 组 ($p < 0.01$)。

表 2 不同外源激素对猪卵母细胞体外成熟的影响

成熟培养液	培养卵母细胞数	成熟卵母细胞数	成熟率/%
PMSG + hCG + FSH	245	174	71.0
FSH + LH	248	170	68.5
hMG	244	124	50.8

2.3 血清对猪卵母细胞体外成熟及电激活后孤雌胚胎发育的影响

以 mM199 为基础培养基, 在添加 10 IU/mL PMSG, 10 IU/mL hCG 和 2.5 IU/mL FSH 的同时比较了添加与不添加 10% FBS 的差别。结果显示(表 3), 添加 FBS 组卵丘细胞扩散要明显好于无血清组, 成熟率上无血清组略高于有血清组, 但两者无统计学差异 ($p > 0.05$)。电激活后, FBS 组卵裂率显著高于无血清组 ($p < 0.05$), 但桑囊率两者无显著差异 ($p > 0.05$)。

表3 血清对猪卵母细胞体外成熟及电激活后胚胎发育的影响

成熟培养液	培养卵数	成熟卵数/%	电激活卵数	卵裂数/%	桑囊胚/%
(-)FBS	186	125(67.2)	95	61(64.2)	20(21.1)
(+)FBS	194	129(66.5)	96	79(82.3)	21(21.9)

2.4 猪卵泡液对猪卵母细胞体外成熟及电激活后孤雌胚胎发育的影响

结果表明(表4), 添加 PFF 组卵母细胞成熟率要高于不添加组, 但两者无统计学差异($p > 0.05$), 激活后, 添加 PFF 组卵裂率明显高于不添加组($p < 0.05$), 但桑囊率两者差异不显著($p > 0.05$), 添加 PFF 卵丘细胞扩散要好于不添加组。

表4 PFF对猪卵母细胞体外成熟及电激活后孤雌胚胎发育的影响

成熟培养液	培养卵数	成熟卵数/%	电激活卵数	卵裂数/%	桑囊胚/%
(+)PFF	198	141(71.2)	125	98(78.4)	38(30.4)
(-)PFF	185	120(64.9)	104	65(62.5)	32(30.8)

2.5 EGF对猪卵母细胞体外成熟及电激活后孤雌胚胎发育的影响

由实验5的结果可以看出(表5), 添加 EGF 组卵母细胞成熟率稍高于不添加组, 但两者在成熟率上无显著差异, 电激活后, 添加 EGF 组胚胎卵裂率与发育到桑椹胚和囊胚的比例明显高于不添加组($p < 0.05$), 另外添加 EGF 组卵丘细胞扩散要好些。

表5 EGF对猪卵母细胞体外成熟及电激活后孤雌胚胎发育的影响

成熟培养液	培养卵数	成熟卵数/%	电激活卵数	卵裂数/%	桑囊胚/%
(+)EGF	143	106(74.1)	98	82(83.7)	40(40.8)
(-)EGF	140	99(70.7)	88	54(61.4)	20(22.7)

3 讨论

M199 和 mM199 两者成分差异主要在 mM199 中添加了 PVA、葡萄糖、丙酮酸钠和半胱氨酸(Cys)。但主要起作用的还是 Cys, 因为 Cys 是谷胱甘肽(GSH)的组成成分, GSH 是细胞内的主要自由巯基, 在细胞生长、氨基酸转移及 DNA 和蛋白质合成中起到重要的生理作用, 并且可以减轻氧压力, 起到抗氧化的作用。NCSU-23 目前是猪胚胎培

养效果很好的一种培养液^[5], 本实验结果显示, 使用 NCSU-23 为培养基猪卵母细胞体外成熟效果较差, 可能是因为 NCSU-23 配方相对简单, 缺乏蛋白质组分, 不能完全提供卵母细胞成熟过程所需的营养成分, 从而不易恢复卵母细胞核成熟的缘故。

促性腺激素对猪卵母细胞体外成熟的启动发挥重要作用, 其中 FSH 是猪卵母细胞成熟的关键激素^[6]。卢晟盛等^[7]研究表明, 添加外源激素 FSH+LH, 猪卵母细胞成熟率最高可达 64.3%。秦鹏春等^[8]认为, 添加 PMSG 可促进猪卵母细胞的体外成熟。本实验结果显示使用 PMSG+hCG+FSH 组合较 FSH+LH 组合虽然提高卵母细胞成熟率, 但两者之间无统计学差异。尿促性腺激素(hMG)是从绝经期妇女尿中提取的, 既有 FSH 作用, 又有 LH 的作用, 可促进卵巢分泌功能和促使卵巢内卵泡发育和成熟。hMG 对牛的卵母细胞成熟有较好的促进作用^[9], 但我们发现, hMG 在猪卵母细胞成熟上效果较差, 显著低于 PMSG+hCG+FSH 组和 FSH+LH 组, 提示不同的物种对 hMG 的活性成分的剂量及反应性有异。

血清中含有能量物质、氨基酸、维生素、激素和生长因子等成分, 在许多体外培养系统中是主要的添加物, 但血清中也含有许多未知的成分, 不同批次的血清对培养结果有一定的影响。胎牛血清可减少小鼠卵母细胞的透明带硬化, 虽然胎牛血清对小鼠卵母细胞核成熟无显著影响, 但显著提高体外授精后的分裂率和囊胚率^[10]。Funahashi 等^[11]报道, 添加胎牛血清核成熟率无显著差异, 但体外受精后有利于雄原核的形成。本研究显示, 在相同实验条件下, 无血清组较添加血清组卵母细胞成熟率要高, 但差异并不显著, 添加血清组电激活后卵裂率要显著高于无血清组, 但桑囊率无显著差异。

PFF 的成分也极为复杂, 含有大量来自血清的生化因子和卵母细胞及卵泡细胞的分泌因子。有关 PFF 对猪卵母细胞成熟及以后发育的影响, 不同的学者报道的结果不太一致^[12,13], 可能与 PFF 所含的因子随机体内分泌状态的变化而变化有关, 因而不同批次制备的卵泡液对猪卵母细胞成熟效果也就不稳定。本实验中, 我们使用来自于同一批制备的 PFF, 发现添加 PFF 对卵母细胞成熟率及电激活后的桑囊率无显著影响, 但能提高电激活后胚胎的卵

裂率。

EGF可促进卵丘细胞的蛋白质合成,间接促进卵母细胞核质成熟。Abeydeera等^[14]曾报道在无蛋白质成熟液中添加EGF,对猪卵母细胞第一极体排出无显著影响,但可增加卵丘细胞扩散、胞质内GSH含量、体外受精后的卵裂率、囊胚率及囊胚细胞数。Kishida等^[15]在成熟培养液中添加EGF和半胱氨酸可显著提高猪卵母细胞成熟率和单精子注射后的卵裂率,认为添加EGF和半胱氨酸可增加卵母细胞中GSH的含量从而促进胚胎的发育。本实验结果表明,添加EGF组猪卵母细胞成熟率要高于不添加组。电激活后,添加EGF组胚胎卵裂率与发育到桑椹胚和囊胚的比例明显高于不添加组,提示EGF有利于提高卵母细胞成熟的质量,获得了更强的发育能力。

卵丘细胞扩展是促卵丘扩展因子作用的结果。在体外,卵丘细胞扩展可以由FSH诱导,EGF通过与卵丘细胞上EGF受体结合使得酪氨酸磷酸化,细胞骨架中肌动蛋白重排,增加透明质酸的分泌,引起卵丘细胞扩展^[16]。卵丘细胞扩展同时为精子提供良好的受精环境。我们在实验过程观察到,添加FBS卵丘细胞扩散最好,添加PFF,EGF次之,不添加组扩展最差。同时也发现卵丘细胞扩散与卵母细胞第一极体排出之间无直接相关性,但均能提高电激活后的卵裂率。这提示卵丘细胞扩散程度好在一定程度上促进了卵母细胞胞质的成熟。深入了解卵丘细胞扩散的分子机制将有助于改善卵母细胞体外成熟培养及其以后的胚胎培养条件。

总之,在本实验条件下,使用mM199添加PMSG+hCG+FSH及EGF的无蛋白质培养系统较有利于猪卵母细胞体外成熟及电激活后胚胎的发育。另外,卵丘细胞扩散与卵母细胞第一极体排出之间无直接相关性,但扩散程度好可能在一定程度上促进了卵母细胞胞质的成熟。

参 考 文 献

- Onishi A, Iwamoto M, Akita T, et al. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science*, 2000, 289: 1188—1190
- Polejaeva I A, Chen S H, Vaught T D, et al. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, 2000, 407: 86—90
- Gruppen C G, Verma P J, Du Z T, et al. Activation of *in vivo*- and *in vitro*-derived porcine oocytes by using multiple pulses. *Reprod Fertil Dev*, 1999, 11: 457—462
- Niemann H, Rath D, Wrenzycki C. Advances in biotechnology: New tools in future pig production for agriculture and biomedicine. *Reprod Domest Anim*, 2003, 38(2): 82—89
- Machaty Z, Day B D, Prather R S. Development of early porcine embryos *in vitro* and *in vivo*. *Biol Reprod*, 1998, 59: 451—455
- Xia G L, Kazuhiro K, Junko N, et al. Short time priming of pig cumulus oocytes complex with FSH and forskolin in the presence of hypoxanthine stimulate cumulus cell secretes a meiosis activating substance. *Theriogenology*, 2000, 53(9): 1807—1815
- 卢晟盛, 卢克焕. 促性腺激素对猪卵母细胞体外成熟的影响. *西南农业大学学报*, 2004, 26(6): 769—772
- 秦鹏春, 谭景和, 吴光明, 等. 猪卵巢卵母细胞体外成熟与体外受精的研究. *中国农业科学*, 1995, 28(3): 58—66
- Rieger D, Luciano A M, Modena S, et al. The effects of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on the metabolic activity, nuclear maturation and subsequent development of cattle oocytes *in vitro*. *J Reprod Fertil*, 1998, 112: 123—130
- Epping J J, Wiggsworth K, O'Brien M J. Comparison of embryonic developmental competence of mouse oocytes grown with and without serum. *Mol Reprod Dev*, 1992, 32: 33—40
- Funahashi H., Day B N. Effects of different serum supplements in maturation medium on etotic and cytoplasmic maturation of pig oocytes. *Theriogenology*, 1993, 39: 965—973
- Yoon K W, Shin T Y, Park J I, et al. Development of porcine oocytes from preovulatory follicles of different sizes after maturation in media supplemented with follicular fluids. *Reprod Fertil Dev*, 2000; 12(3—4): 133—139
- Tatemoto H, Muto N, Sunagawa I, et al. Protection of porcine oocytes against cell damage caused by oxidative stress during *in vitro* maturation: Role of superoxide dismutase activity in porcine follicular fluid. *Biol Reprod*, 2004, 71: 1150—1157
- Abeydeera L R, Wang W H, Cantley T C, et al. Development and viability of pig oocytes matured in a protein-free medium containing epidermal growth factor. *Theriogenology*, 2000, 54(5): 787—797
- Kishida R, Lee E S, Fukui Y. *In vitro* maturation of porcine oocytes using a defined medium and developmental capacity after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*, 2004, 62(9): 1663—1676
- Prochazka R, Kalabb P, Nagyova E. Epidermal growth factor-receptor tyrosine kinase activity regulates expansion of porcine oocyte-cumulus cell complexes. *Biol Reprod*, 2003, 68: 797—803