DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.06.020
第25卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 6
2003年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2003

文章编号:1000-5404(2003)06-0511-03

论著

猪卵母细胞在不同培养液中成熟后的发育潜力

叶华虎,魏 泓,陈俊颖 (第三军医大学实验动物中心,重庆 400038)

提 要:目的 优化猪胚胎体外生产培养系统。方法 将猪卵母细胞在不同培养液中行体外成熟、体外受精,比较成熟率和卵裂率。结果 促性腺激素明显提高猪卵母细胞成熟率,其中以15 IU/ml FSH+30 IU/ml LH成熟率、卵裂率最高,分别为62%和15%。M199和NCSU-23基础培养液中的成熟率相近,但二者的卵裂率差异显著(15.7% *vs* 36%);两种基础培养液中添加150 μmol/L半胱氨酸后,仅M199培养液中出现促卵裂效应($P<0.05$);添加1 mmol/L dbcAMP后,卵母细胞的GVBD被阻止,去除dbcAMP后继续培养22 h,实验组的成熟率和卵裂率分别为76.1%~83.3%和43.9%~52.9%率,显著高于基础液组和半胱氨酸单独添加组。结论 促性腺激素是猪卵细胞体外成熟的重要调节因子;dbcAMP通过调节卵体外成熟动力学,促卵母细胞分裂同步化,提高成熟和发育能力。

关键词:卵母细胞;体外成熟;体外受精;dbcAMP;猪
中图法分类号:S814.8 文献标识码:A

Developmental competence of pig oocytes maturation in different culture mediums

YE Hua-hu, WEI Hong, CHEN Jun-ying (Laboratory Animal Center, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To optimize systems of pig embryo *in vitro* production. Methods Pig oocytes were matured and fertilized *in vitro* in different culture mediums. Maturation rate and cleavage rate were analyzed. Results Gonadotropin induced maturation of pig oocytes *in vitro*, and improved the frequence of oocytes developed into M-Ⅱ. The highest maturation and cleavage rates, present in medium with 15 IU/ml FSH+30 IU/ml LH, were 62% and 15% respectively. There was no difference in maturation rates in M199 and NCSU-23(48.2% *vs* 56.9%). However, difference in cleavage rate was observed in these two mediums(15.7% *vs* 36%, $P<0.01$). When 150 μmol/L cysteine was added into M199 and NUCS-23 basic mediums, the effect of cysteine on cleavage only appeared in M199. GVBD was blocked in mediums with 1 mmol/L dbcAMP during first 22 h culture, while the frequencies of maturation and cleavage were 76.1%—83.3% and 43.9%—52.9% respectively in dbcAMP treatment groups, higher than those in other groups. Conclusions Gonadotropin is one of the most important factors for pig oocytes to develop into M-Ⅱ *in vitro*. dbcAMP improves maturation rate and developmental competence following *in vitro* fertilization by the regulation of kinetics of pig oocytes.

Key words: oocytes; *in vitro* maturation; *in vitro* fertilization; dbcAMP; pig

猪卵母细胞IVM-IVF系统目前已得到较大改进和提高,但受精率、卵裂率低,卵裂滞后;多精受精率高;囊胚发育率低,囊胚卵裂球数目少等缺陷依然存在[1]。Sun等[2]归因于培养基缺陷致胞质成熟不充分。本实验拟通过比较不同培养基中卵母细胞的成熟率和卵裂率,以期建立猪胚胎体外生产的优化培养系统。

1 材料与方法

1.1 药品及试剂

FSH、LH、PMSG、hCG购于宁波激素制品厂,17β-雌二醇(E_2)、dbcAMP购于Sigma公司,L-半胱氨酸购于上海康达氨基酸厂。

1.2 卵丘-卵母细胞复合体的获取

由屠场采集2~5岁龄经产母猪卵巢,放入添加双抗的30~35 ℃灭菌生理盐水中,3 h内送回实验室。切割收集直径3~6 mm卵泡卵母细胞,选择卵丘在3层及以上且包裹致密的卵丘-卵母细胞复合体(COCs),用于成熟培养。

1.3 卵母细胞体外成熟

基础成熟培养液为含20%胎牛血清、1 μg/ml E_2、15 IU/ml

基金项目:国家重点研究发展规划资助项目("973"项目,G2000016106)
作者简介:叶华虎(1970—),男,四川省绵阳市人,博士研究生,助理研究员,主要从事哺乳动物胚胎工程及转基因方面的研究。电话:(023)68752053
通信作者:魏 泓,E-mail:Weihong@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2002-09-06;修回日期:2002-11-16

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

FSH、30 IU/ml LH 的 M199 和 NCSU-23 两种。COCs 经 mPBS 洗涤3次后，放入预平衡 1～3 h 的 100μl 成熟液中，每滴 15 ～20 枚，于 38.5℃、5% CO_2、饱和湿度条件下培养 44 h；dbcAMP 组在成熟培养 0～22 h 时间段添加，22～44 h 去除 dbcAMP。

1.4 卵母细胞成熟检查

体外培养44 h 的卵母细胞，经 0.3% 透明质酸酶 mPBS 消化除去丘，10μg/ml Hoechst33342 染色[3]，荧光显微镜观察染色体和极体，M-Ⅱ为成熟卵。

1.5 猪精子获能及体外受精

采集健康公猪鲜精液，用 10 mmol/L Caffeine 的 TALP 液（不含葡萄糖）洗涤3次，调节精子浓度为 1×10^6 个/ml，等量加入 50μl 预平衡 1～2 h 含 20μg/ml Heparin 的 TALP，制成 100μl 受精微滴。成熟卵母细胞轻轻吹打部分去丘，移入受精微滴，每滴 15～20 枚卵，精卵共同作用 12～16 h。

1.6 受精卵培养

精卵共同作用后，转入 100μl 微滴培养，培养条件为 38.5℃、5% CO_2、饱和湿度，培养基为 NCSU-23 添加 20% 胎牛血清。48 h 染色检查胚胎发育。

1.7 统计学分析

数据用 χ^2 检验分析。

2 结果

2.1 激素对猪卵母细胞体外成熟、体外受精的影响

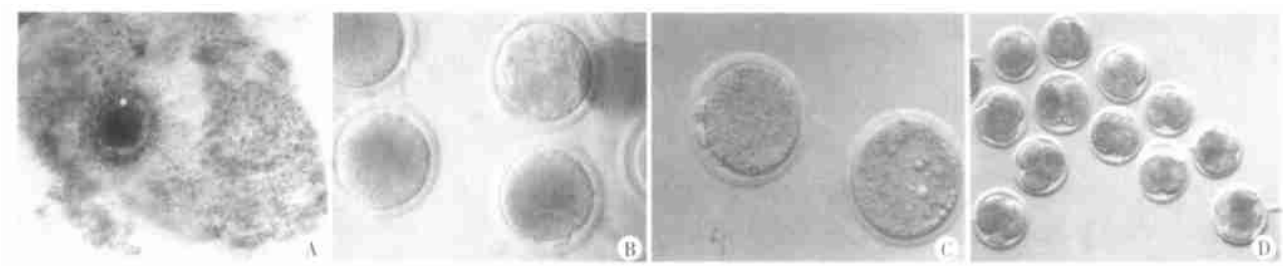
M199 基础培养液中添加不同激素浓度，试验组的卵丘扩散早，成熟率高，但激素浓度对成熟率和卵裂率表现为双向效应，当 FSH 在 0～15 IU/ml、LH 在 0～30 IU/ml，成熟率和卵裂率呈浓度依赖性，而当 FSH 在 15～30 IU/ml、LH 在 30～60 IU/ml，表现为递减趋势，其中 15 IU/ml FSH＋30 IU/ml LH 组成熟率、卵裂率最高，分别为 62% 和 15%，显著高于其他浓度组，见表1。故在以后的试验中都添加 15 IU/ml FSH＋30 IU/ml LH。

表1 激素浓度对猪卵母细胞体外成熟及卵裂的影响

Tab 1 Effects of gonadotropin concentration on maturation and cleavage of pig oocytes

Gonadotropins	Maturation rate at 44 h of IVM			Cleavage rate at 72 h post IVF		
	Oocytes	M-Ⅱ	Rate(%)	Oocytes	Cleavage	Rate(%)
0	112	22	19.6^{a}	58	3	5.2^{a}
5 IU/ml FSH＋10 IU/ml LH	116	40	34.5^{bc}	64	5	7.8^{ab}
10 IU/ml FSH＋20 IU/m lLH	136	66	48.5^{d}	66	7	10.6^{ab}
15 IU/ml FSH＋30 IU/ml LH	142	88	62.0^{e}	60	9	15.0^{b}
20 IU/ml FSH＋40 IU/ml LH	120	54	45.0^{cd}	58	5	8.6^{ab}
30 IU/ml FSH＋60 IU/ml LH	110	36	32.7^{b}	64	5	7.8^{ab}

a, b, c, d, e: Values with difference superscript differ within colums ($P<0.05$)



A: COC with expanded cumulus after 44 h culture; B: Oocytes with the first polar body after maturation *in vitro*; C: Oocytes with second polar body after fertilization *in vitro*; D: 2～4 cell embryos

图1 猪卵母细胞体外成熟与体外受精

Fig 1 Pig oocytes maturation and fertilization *in vitro*

2.2 培养基、半胱氨酸、dbcAMP 对猪卵母细胞体外成熟和体外受精的影响

不添加半胱氨酸和/或 dbcAMP，M199 和 NCSU-23 的成熟率分别为 48.2% 和 56.9%，差异不显著，但受精后的卵裂率分别为 15.7% 和 36%，差异显著；两种培养基中添加 dbcAMP 后，卵丘扩散延迟，成熟率（76.1%～83.3%）、卵裂率（43.9%～52.9%）均显著提高；单独添加半胱氨酸仅在 M199 培养液中有促卵裂率作用（30.6% vs 15.7%），见表2。

2.3 dbcAMP 对猪卵母细胞体外成熟进程的影响

猪卵母细胞在添加 dbcAMP 的 NCSU-23（含半胱氨酸）中培养，分别于 22、44 h 染色检测发育阶段，结果见表3。培养 22 h，实验组卵丘几乎不见扩散，细胞多数维持在 GV 期；培养 44 h，实验组卵丘中度扩散，卵母细胞胞质饱满，第一极体明显易见；而对照组部分成熟卵卵周隙大，胞质皱缩，核物质凝固，呈老化相，两者成熟率差异显著。

表2 猪卵母细胞在不同培养液中的成熟率和卵裂率

Tab 2 Maturation rate and cleavage rate of pig oocytes in different mediums

Mediums	Cysteine 150μmol/L	dbcAMP 1 mmol/L	Oocytes	Maturation rate at 44 h of IVM			Cleavage rate at 72 h post IVF		
				COCs	M-Ⅱ	Rate(%)	COCs	Cleavage	Rate(%)
M199	-	-	126	56	27	48.2^{a}	70	11	15.7^{a}
	＋	-	114	52	26	50.0^{a}	62	19	30.6^{b}
	-	＋	150	68	54	79.4^{b}	82	36	43.9^{bcd}
	＋	＋	149	71	54	76.1^{b}	78	38	48.7^{cd}
NCSU-23	-	-	115	65	37	56.9^{a}	50	18	36.0^{bc}
	＋	-	130	72	40	55.6^{a}	58	20	34.5^{bc}
	-	＋	135	67	53	79.1^{b}	68	33	48.5^{cd}
	＋	＋	130	60	50	83.3^{b}	70	37	52.9^{d}

a, b, c, d: Values with difference superscript differ within colums ($P<0.05$)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 3　dbcAMP 对猪卵母细胞体外成熟进程的影响

Tab 3　Effects of dbcAMP on pig oocytes maturation processes *in vitro*

dbcAMP	Maturation process at 22 h of IVM				Maturation process at 44 h of IVM			
1 mmol/L	COCs	GV	MI ~ MII	MII	COCs	GV	MI ~ MII	MII
-	68	19(27.9[a])	43(63.2[a])	6(8.9)	70	6(8.6)	24(34.3[a])	40(57.1[a])
+	72	42(58.3[b])	26(37.5[b])	3(4.2)	78	6(7.7)	10(12.8[b])	62(79.5[b])

a, b: Values with difference superscript differ within colums ($P < 0.05$)

3　讨论

促性腺激素在哺乳动物卵母细胞体外成熟研究中被广泛应用[1~5]。本研究表明, 即使 3 mm 以上的中等猪卵泡卵母细胞体外成熟也需要激素作用, 但激素浓度的影响表现为双向性, 低剂量范围内为正效应, 过高剂量呈现抑制趋势, 其机制值得进一步探讨。

本实验在首先确定适宜的激素浓度条件下, 比较了 M199、NCSU-23 两种培养液中添加半胱氨酸和/或 dbcAMP 对猪卵细胞成熟效率和发育潜力的影响。结果表明, dbcAMP 对猪卵母细胞成熟的影响作用最明显, dbcAMP 处理组卵细胞 GV 期延长, 成熟卵形态结构好, 成熟率(76.1% ~ 83.3 %)、卵裂率(43.9% ~ 52.9 %)均显著高于对照组, 与前人的研究结果一致[6,7]。而对照组部分成熟卵卵周隙大, 胞质皱缩, 核物质凝固呈老化相, 表明卵细胞体外成熟进程差异较大。dbcAMP 是卵细胞减数分裂恢复的可逆性抑制剂, 它改变卵母细胞体外成熟动力学, 使之更接近于自然成熟程序[6~8], 表现在三方面: ①延长 GV 期, 维持核转录活性, 使卵细胞充分获能, 为早期胚胎发育准备物质基础[6,7]; ②调节 MPF、MAP 等与成熟紧密相关蛋白激酶的活性及浓度, 刺激卵细胞由 M-Ⅰ向 M-Ⅱ转化[6,7,9]; ③促进卵细胞成熟分裂周期同步化, 减少老化卵比例。

卵母细胞成熟包括胞核成熟、胞质成熟两方面, 核成熟是精子获得穿越透明带的前提, 而胞质成熟是胚胎继续发育的物质基础。谷胱苷肽(GSH)对早期猪胚胎发育的促进作用近来受到关注, 有学者提出 GSH 含量可以作为猪卵细胞胞质成熟的评判指标[1,10,11]。本实验不完全支持上述观点, 我们发现, 半胱氨酸仅在 M199 基础培养液中有明显的促卵裂效应, 而在添加了 dbcAMP 的 M199 以及 NCSU-23 培养基中, 尽管卵裂率较不添加组高 5%左右, 但统计学上无显著差异。说明猪卵细胞受精后的发育, 需要胞内 GSH 达到某一基础水平, 同时在有其他胞质因子的共同参与才能完成。

猪卵细胞目前经体外成熟培养都能达到较高的核成熟水平, 但受精率、前核形成率、卵裂率都较自然成熟卵低。Nagai[1] 认为培养系统不适导致成熟不充分是关键。在本实验的各种成熟培养体系中, 卵裂率最高为 50 %左右, 高于目前的同类报道[1,12], 但仍远远低于牛、羊、鼠等其他哺乳动物; 此外, 尚有 30 %左右的成熟卵不能继续发育, 表明猪卵细胞 IVM-IVF-IVC 系统还有待于进一步完善。

参考文献:

[1] Nagai T. The improvement of *in vitro* maturation systems for bovine and porcine oocytes[J]. Theriogenology, 2001, 55(6): 1291—1301.

[2] Sun Q Y, Lai L, Bonk A, *et al*. Cytoplasmic changes in relation to nuclear maturation and early embryo developmental potential of porcine oocytes: effects of gonadotropins, cumulus cells, follicular size, and protein synthesis inhibition[J]. Mol Reprod Dev, 2001, 59(2): 192—198.

[3] 叶华虎, 陈振文, 任文陟, 等. 犬卵母细胞体外成熟的影响因素[J]. 中国兽医学报, 1998, 18(5): 532—535.

[4] Mattioli M, Bacci M L, Galeati G, *et al*. Effects of LH and FSH on the maturation of pig oocytes in vitro[J]. Theriogenology, 1991, 36(1): 95—106.

[5] Bing Y Z, Nagai T, Rodriguez-Martinez H. Effects of cysteine, FSH and estradiol-17 beta on *in vitro* maturation of porcine oocytes[J]. Theriogenology, 2001, 55(4): 867—876.

[6] Funahashi H, Cantley T C, Day B N. Synchronization of meiosis in porcine oocytes by exposure to dibutyryl cyclic adenosine monophosphate improves developmental competence following *in vitro* fertilization[J]. Biol Reprod, 1997, 57(1): 49—53.

[7] Guixue Z, Luciano A M, Coenen K, *et al*. The influence of cAMP before or during bovine oocyte maturation on embryonic developmental competence [J]. Theriogenology, 2001, 55(8): 1733—1743.

[8] 韩毅冰, 施维民, 秦鹏春. 猪不同直径卵泡卵母细胞体外培养的成熟潜力[J]. 中国兽医学报, 2000, 20(2): 183—187.

[9] Ledan E, Polanski Z, Terret M E, *et al*. Meiotic maturation of the mouse oocyte requires an equilibrium between cyclin B synthesis and degradation [J]. Dev Biol, 2001, 232(2): 400—413.

[10] Coy P, Ruiz S, Romar R, *et al*. Mturation, fertilization, and competence development of pig oocytes matured under different systems[J]. Theriogenology, 1999, 51(4): 799—812.

[11] Yamauchi N, Nagai T. Male pronuclear formation in denuded porcine oocytes after *in vitro* maturation in the presence of cysteamine[J]. Biol Reprod, 1999, 61(3): 828—833.

[12] Brussow K P, Torner H, Kanitz W, *et al*. *In vitro* technologies related to pig embryo transfer[J]. Reprod Nutr Dev, 2000, 40(5): 469—480.

(编辑　陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net