

影响山羊体外受精的因素*

周佳勃 吴延光 罗明久 韩东 刘丽清 常仲乐 谭景和**

山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018

摘要 以屠宰山羊卵母细胞为材料研究了公羊个体、附睾不同部位精子、成熟培养和受精时卵丘存在与否、卵丘扩展程度及卵龄对山羊体外受精的影响。结果表明: 1) 不同公羊精液在受精、卵裂和桑椹/囊胚率上都有显著差异; 2) 附睾尾精子和鲜精的受精、卵裂和桑椹/囊胚率无显著差异, 但显著高于附睾体和附睾头精子; 3) 成熟培养 24 和 27 h 卵母细胞的桑椹胚/囊胚率显著高于培养 21 和 30 h 卵母细胞; 4) 卵丘扩展 3 和 4 级卵母细胞受精和桑椹胚/囊胚率显著高于扩展 0 和 1 级卵母细胞; 5) 成熟培养前机械去卵丘严重影响卵母细胞体外受精和桑椹胚/囊胚率; 6) 受精前完全去掉卵丘显著影响桑椹胚/囊胚率 [动物学报 50(2): 216-221, 2004]。

关键词 卵母细胞 精子 体外受精 卵丘 山羊

Factors influencing *in vitro* fertilization in goats*

ZHOU Jia-Bo, WU Yan-Guang, LUO Ming-Jiu, HAN Dong, LIU Li-Qing, CHANG Zhong-Le, TAN Jing-He**

College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Taian 217018, Shandong, China

Abstract We studied the effect of buck individuality, epididymal origin of spermatozoa, presence and absence of cumulus during *in vitro* maturation and fertilization and length of maturation culture *on in vitro* fertilization and embryo development in goats. The results are summarized as follows: 1) semen from different bucks produced significantly different rates of fertilization, cleavage and morulae/blastocysts; 2) rates of fertilization, cleavage and morulae/blastocysts by spermatozoa from cauda epididymidis were not different significantly from those of ejaculated spermatozoa but were markedly higher than those of spermatozoa from corpus epididymidis, and those of spermatozoa from corpus epididymidis were significantly higher than those of spermatozoa from caput epididymidis; 3) there was no significant difference in fertilization rates among oocytes *in vitro* matured for 24, 27 and 30 h, but fertilization rates of oocytes matured *in vitro* for 21 h declined significantly; rates of morulae/blastocysts in oocytes matured for 21 and 30 h were significantly lower than rates among oocytes matured for 24 and 27 h; 4) rates of fertilization and morulae/blastocysts in oocytes with 3 or 4 grade cumulus expansion were significantly higher than those of oocytes with 0 or 1 grade cumulus expansion; 5) mechanical removal of cumulus prior to *in vitro* maturation severely affected *in vitro* fertilization and embryo development to morulae/blastocysts of goat oocytes; 6) complete or partial removal of cumulus prior to *in vitro* fertilization did not affect fertilization and cleavage of oocytes, but complete removal of the cumulus significantly decreased the rate of morulae/blastocysts. In summary, *in vitro* maturation and fertilization of goat oocytes were affected by many factors [Acta Zoologica Sinica 50(2): 216-221, 2004].

Key words Oocyte, Spermatozoa, *In vitro* fertilization, Cumulus oophorus, Goat

随着胚胎工程技术的进一步研究和商业化, 对胚胎的需求量日益增加。通过卵泡卵母细胞体外成熟、体外受精和体外培养 (*In vitro* maturation, fertilization and embryo culture, IVM-IVF-IVC) 工

厂化生产胚胎可提高卵母细胞的利用率, 生产大量优质廉价胚胎具有广阔的应用前景。然而, 山羊卵母细胞的 IVM-IVF-IVC 技术发展相对缓慢。Hanada (1985) 用超排得到的山羊卵母细胞体外

2003-07-07 收稿, 2003-09-14 接受

* 国家科技部“973”项目(编号 G200016107)和山东省良种产业化(三 0)工程项目资助 [This research was funded by the “973” Project of China Science and Technology Ministry (Grant No. G200016107) and the Good Breeds Extension Program of Shandong Province, China]

** 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: tanjh@sdau.edu.cn

© 2004 动物学报 Acta Zoologica Sinica

受精获得首例试管山羊, 钱菊汾等 (1992) 用山羊体外成熟卵母细胞体外受精获得后代。目前, 山羊卵巢卵母细胞的 IVM-IVF-IVC 系统还不稳定, 可重复性差。这里不仅有体外成熟卵母细胞自身的质量问题, 也有精子质量的问题。

关于卵丘在卵母细胞体外成熟培养中是否必需, 还存在争议。Eppig and Downs (1989) 对小鼠卵丘卵母细胞复合体 (Cumulus-oocytes complexes, COC) 和裸卵 (Denuded oocyte, DO) 进行体外培养发现, 裸卵的生发泡破裂 (Germinal vesicle breakdown, GVBD) 率和第一极体的排放率高于或者等于 COC 的比例。Hawk et al. (1992) 发现, 无论在成熟期间或成熟后去掉部分卵丘, 牛卵母细胞受精率及扩展囊胚比例都明显增高。而有些学者则认为, 没有卵丘卵母细胞不能很好成熟 (Crosby et al., 1981; Fukui and Sakuma, 1980)。对大鼠、小鼠和牛的研究表明, 卵母细胞如果在体外成熟前是裸卵, 受精后的卵裂率和原核形成率都下降 (Schoreder and Eppig, 1984; Sirard et al., 1988; Vanderhyden and Armstrong, 1989)。

卵母细胞成熟后发生的卵丘扩展有助于输卵管收集卵母细胞, 而且还能在受精时发挥作用 (Meizel, 1985; Salustri et al., 1989)。Hunter and Moor (1987) 主张根据卵丘扩展程度判断牛卵母细胞体外成熟与否, Gledt et al. (1996) 发现牛卵母细胞体外成熟时间由 24 h 延长到 28 h, 体外受精后的卵裂和桑椹胚率下降。Marquant-Le Guenne et al. (1990) 报道, 3 头公牛个体之间体外受精率存在显著差异。因此, 关于精子来源、卵丘及卵母细胞成熟度对山羊体外受精和胚胎发育的影响, 还有待进一步研究。本文以屠宰山羊卵巢卵母细胞为实验材料系统研究了公羊个体、附睾不同部位精子、成熟培养和受精过程中卵丘存在与否、成熟时卵丘扩展程度以及卵龄等因素对山羊体外受精的影响。

1 材料与方法

1.1 卵母细胞的收集和成熟培养

屠宰山羊卵巢在 30 - 35 °C 灭菌生理盐水 (添加 100 IU/ml 青霉素和 50 µg/ml 链霉素) 中 3 h 内带回实验室。充分清洗后, 用 10 ml 注射器 (8 号针头) 抽取卵巢表面直径 2 - 6 mm 卵泡内的卵丘卵母细胞复合体, 置于含有 0.1% PVA 的 Dulbecco's PBS (GIBCO) 中。在实体显微镜下收

集 COC, 选取卵丘细胞层完整、卵母细胞质均匀的 COC 用于培养。

成熟培养液为添加 10% (v/v) FCS (GIBCO)、10 IU/ml PMSG (天津实验动物中心) 的 TCM-199 (GIBCO) (孙兴参等, 2003)。表面覆盖薄层矿物油 (Sigma, M-8410) 的 100 µl 培养滴, 预平衡 3 - 4 h 后用于培养。将洗净的 COC 移入已平衡好的培养滴中, 每滴 15 - 20 枚, 于 38.5 °C、5% CO₂、100% 湿度的 CO₂ 培养箱内进行成熟培养。

1.2 精子获能、体外授精和受精检测

使用假阴道从 3 只成年健康鲁白山羊采集鲜精。先在 6 个 5 ml 离心管中装 2 ml 改进的 DM (Defined medium, 成分明确培养液) 液 (mDM, Younis et al., 1991), 每管在底部加入 70 µl 精液进行上游处理 (Parrish et al., 1986)。1 h 后, 自每个离心管吸取上部 0.7 ml 高活力精液, 混合后再经 200 ×g 离心 10 min。去除上清后检测精子密度。附睾来自随机屠宰的成年公山羊。用剪刀分段剪下附睾头、体和尾部, 并分别于 DPBS 液体中用镊子挤压, 使精子分离出来。200 ×g 离心洗涤 1 次, 用 DPBS 重新悬浮精子并检查精子密度。用获能液 (含 50 µg/ml 肝素的 mDM) 将精子密度稀释到 80 ×10⁶ 个/ml 后, 在 38.5 °C 下孵育 45 min 进行获能。

受精液为含有 1 µg/ml 牛磺酸的 TALP 液。成熟培养后的 COC 用受精液洗涤一次后放入 100 µl 的受精滴中, 每滴 18 - 22 枚。然后, 每个受精滴加入 5 µl 获能精子, 最终精子浓度为 3.5 - 4 ×10⁶ 个/ml。授精后, 在 38.5 °C、5% CO₂ 的培养箱中孵育。17 h 后, 去除卵丘细胞和表面粘附的精子。一部分卵母细胞用于检测受精率, 其余卵母细胞继续培养。

在检测受精率时, 卵母细胞压片后在醋酸酒精 (1:3) 固定液中固定 24 h 以上。然后, 用 1% 醋酸地衣红染液染色 1 min, 在相差镜下检查受精情况。带有两个原核和一个精子尾巴的为正常受精。

1.3 胚胎培养及胚胎发育观察

在受精 24 h 后, 把卵母细胞转入胚胎培养液 (TCM-199 添加 0.55 mg/ml 丙酮酸钠、0.146 mg/ml 谷氨酰胺、3.5 mg/ml BSA (GIBCO)、青霉素 100 IU/ml、链霉素 50 µg/ml 和 20% 发情山羊血清) 中培养。20 枚卵母细胞在 100 µl 培养滴中与已培养 48 h 的单层山羊输卵管上皮细胞一起于

38.5%、5% CO₂、95% 空气，饱和湿度下共同培养 7 天。每隔两天半量更换培养液。在受精后 48 h 检查卵裂率，培养 7 天观察桑椹胚和囊胚的发育情况。

1.4 实验设计

1.4.1 公羊个体对体外受精影响的研究 用从 1、2 和 3 号公羊采集的精液分别与体外成熟卵母细胞进行体外受精，观察受精和胚胎发育。

1.4.2 附睾不同部位精子的体外受精 用取自附睾头、附睾体和附睾尾的精子，分别与体外成熟卵母细胞进行体外受精，观察受精和胚胎发育。

1.4.3 卵母细胞成熟培养时间（卵龄）对受精及胚胎发育的影响 用来自两只体外受精效果较好公羊的精液（下同）对成熟培养 21、24、27 和 30 h 卵母细胞进行体外受精，观察受精和胚胎发育。

1.4.4 卵丘扩展程度对体外受精的影响 将成熟培养 27 h COC 卵丘扩展程度分为 0 - 4 级。0 级，没有扩展，卵丘细胞已经贴壁；1 级，最外的 1 - 2 层卵丘细胞扩展；2 级，外侧的几层细胞扩展，开始呈放射状，卵丘细胞间粘液增多；3 级，内层的卵丘细胞也扩展，只有放射冠未扩展；4 级，包括放射冠在内卵丘全部扩展。用鲜精对卵丘扩展不同级别卵母细胞分别进行体外受精。

1.4.5 体外成熟时卵丘细胞有无对受精及发育的影响 取自然裸卵、人工裸卵、带有 1 - 2 层卵丘细胞的卵母细胞和卵丘细胞 3 层以上的卵母细胞进行体外成熟培养，27 h 后分别进行体外受精。

1.4.6 体外受精时卵丘细胞有无对受精和发育的影响 具有 3 层以上卵丘细胞的卵母细胞体外成熟 27 h 后，一部分卵母细胞机械完全或部分去掉卵丘，另一部分保持卵丘完整，分别进行体外受精。

1.5 数据处理

每组实验至少重复 3 次。使用 SPSS 8.0 统计软件，使用 Kolmogorov-Smirnow 确定数据分布型，用 Levene 技术检验方差齐次性。不具正态性的数据经过反正弦平方根转换后，再检验分布型都符合正态分布，然后通过方差分析进行显著性检验， $P < 0.05$ 被认为是差异显著。

2 结果

2.1 不同公羊受精率、卵裂率及桑椹胚/囊胚率的比较

1、2 和 3 号公羊的精液在受精率、卵裂率和桑椹胚/囊胚率上都有显著差异 ($P < 0.05$)。其

中，1 号公羊效果最好，3 号次之，2 号公羊最差（表 1）。

表 1 不同公羊受精率、卵裂率及桑椹胚/囊胚率的比较
Table 1 Rates of fertilization, cleavage and morulae/blastulae of different buck individuals

公羊 Bucks	受精卵数/授 精卵数 (%)	发育胚胎数/培养胚胎数 (%)	
	Fertilized/ inseminated	Embryo developed/cultured embryo (%)	
	oocytes (%)	卵裂 Cleaved	桑椹胚(囊胚) Morula (blastocyst)
1	25/31 (80.6) ^{a*}	105/146 (71.9) ^a	42/146 (28.8) ^a
2	19/40 (47.5) ^b	34/98 (34.6) ^b	8/98 (8.16) ^b
3	17/26 (65.4) ^{ab}	50/79 (63.3) ^{ab}	15/79 (18.9) ^{ab}

*: 同一列中的不同上角标示差异显著。

Different superscripts within one column differ significantly (One-Way ANOVA, $P < 0.05$).

2.2 山羊附睾头、附睾体和附睾尾精子的体外受精能力

表 2 表明，不同来源的精子体外受精能力存在差异。鲜精和附睾尾精子的受精率、卵裂率和桑椹胚/囊胚率无显著差异，但显著高于附睾体精子。而附睾体精子的受精率、卵裂率和桑椹胚/囊胚率又显著高于附睾头精子。

表 2 山羊附睾不同部位精子体外受精效果比较

Table 2 Fertilizing capacity of goat spermatozoa from different parts of the epididymis

精子来源 Sources of spermatozoa	受精卵数/授 精卵数 (%)	发育胚胎数/培养胚胎数 (%)	
	Fertilized/ inseminated	Embryo developed/cultured embryo (%)	
	oocytes (%)	卵裂 Cleaved	桑椹胚(囊胚) Morula (blastocyst)
射出精子 Ejaculate	25/31 (80.6) ^{a*}	85/131 (64.8) ^a	27/131 (20.6) ^a
附睾尾 Cauda	19/25 (76.0) ^a	59/94 (62.7) ^a	14/94 (14.9) ^a
附睾体 Corpus	4/11 (36.3) ^b	10/36 (27.7) ^b	2/36 (5.5) ^b
附睾头 Caput	0/10 (0.0) ^{ab}	0/35 (0.0) ^{ab}	0/35 (0.0) ^{ab}

*: 同一列中的不同上角标示差异显著。

Different superscripts within one column differ significantly (One-Way ANOVA, $P < 0.05$).

2.3 卵母细胞成熟培养时间（卵龄）对受精和胚胎发育的影响

体外成熟培养 24、27 和 30 h 卵母细胞的受精率差异不显著 ($P > 0.05$)，但培养 21 h 卵母细胞

的受精率显著 ($P < 0.05$) 低于其它各组。成熟培养 21 h 和 30 h 卵母细胞的桑椹胚/囊胚率显著低于成熟 24 h 和 27 h 卵母细胞 (表 3)。

表 3 体外成熟不同时间山羊卵母细胞的体外受精率和发育率

Table 3 Fertilization and embryo development of oocytes in vitro matured for different time

体外成熟时间 Maturation time(h)	受精卵数/授 精卵数(%) Fertilized/ inseminated oocytes (%)	发育胚胎数/培养胚胎数(%) Embryo developed/cultured embryo (%)	
		卵裂 Cleaved	桑椹胚(囊胚) Morula (blastocyst)
24	8/11 (72.7) ^b	14/22 (63.6) ^b	4/22 (18.2) ^b
27	16/21 (76.2) ^b	33/49 (67.3) ^b	10/49 (20.4) ^b
30	11/15 (73.3) ^b	24/31 (60.0) ^b	3/31 (9.7) ^b

*: 同一列中的不同上角标示差异显著。

Different superscripts within one column differ significantly (One-Way ANOVA, $P < 0.05$).

表 4 体外成熟卵母细胞卵丘扩展级别对体外受精和胚胎发育的影响

Table 4 Effect of the degree of cumulus expansion on fertilization and embryo development

卵丘扩展级别 Degree of cumulus expansion	受精卵数/授 精卵数(%) Fertilized/ inseminated oocytes (%)	发育胚胎数/培养胚胎数(%) Embryo developed/cultured embryo (%)	
		卵裂 Cleaved	桑椹胚(囊胚) Morula (blastocyst)
0	0/61 (0.0) ^a *	0/85 (0.0) ^a	0/85 (0.0) ^a
1	1/30 (3.3) ^b	0/60 (0.0) ^a	0/60 (0.0) ^a
2	6/40 (15.0) ^c	13/106 (12.3) ^b	0/106 (0.0) ^a
3	25/40 (62.5) ^{ab}	43/90 (47.7) ^{ab}	11/90 (12.2) ^b
4	49/60 (81.6) ^{ac}	83/125 (66.4) ^{ac}	27/125 (21.6) ^{ab}

*: 同一列中的不同上角标示差异显著。

Different superscripts within one column differ significantly (One-Way ANOVA, $P < 0.05$).

2.4 卵丘扩展级别对体外受精的影响

实验结果表明, 0 级扩展的卵母细胞不能受精, 1 级扩展的卵母细胞受精率也较低。而且, 卵丘扩展程度对受精卵的后续发育能力也有严重影响。扩展好 (3 和 4 级) 卵母细胞的受精率和桑椹胚/囊胚率显著 ($P < 0.05$) 高于扩展不好的卵母细胞 (表 4)。

2.5 卵母细胞体外成熟过程中卵丘存在与否对体外受精的影响

从表 5 中可看出, 自然裸卵体外成熟后能够受精但受精率显著 ($P < 0.05$) 低于 1 - 2 层和 3 层以上卵丘的卵母细胞。成熟前机械去除卵丘严重影响山羊卵母细胞的体外受精率和桑椹胚/囊胚率。1 - 2 层与多层卵丘细胞卵母细胞的受精率和桑椹胚/囊胚率差异不显著 ($P > 0.05$)。

表 5 卵母细胞成熟培养时卵丘存在与否对体外受精的影响

Table 5 Effect of cumulus during in vitro maturation on fertilization and embryo development

卵丘 Cumulus status	受精卵数/授 精卵数(%) Fertilized/ inseminated oocytes (%)	发育胚胎数/培养胚胎数(%) Embryo developed/cultured embryo (%)	
		卵裂 Cleaved	桑椹胚(囊胚) Morula (blastocyst)
自然裸卵 Natur- ally denuded	5/40 (12.5) ^a	(8.3) ^a	(0.0) ^a
人工裸卵 Artifi- cially denuded	29/66 (43.9) ^b	(35.6) ^b	(10.6) ^b
1 - 2 层卵丘细 胞 With 1 - 2 layers of cumulus cells	31/40 (77.5) ^{ab}	(65.2) ^{ab}	(20.7) ^{ab}
3 层卵丘细胞 With 3 or more layers of cumulus cells	56/68 (82.3) ^{ab}	(67.0) ^{ab}	(23.5) ^{ab}

*: 同一列中的不同上角标示差异显著。

Different superscripts within one column differ significantly (One-Way ANOVA, $P < 0.05$).

2.6 受精时卵丘存在与否对体外受精的影响

本实验的结果表明, 在受精前完全去掉或者部分去掉卵丘对受精率和卵裂率没有显著影响, 但受精前完全去掉卵丘对于胚胎的后续发育有严重影响, 桑椹胚/囊胚率显著低于带卵丘卵母细胞。

3 讨论

一些实验表明, 公畜个体差异对体外受精的受精率和卵裂率影响很大。这种现象在牛上比较明显。Marquant-Le Guienne et al. (1990) 的研究证实, 从 3 只公牛采集的精液分别获能后, 进行体外受精, 受精率有明显差异 (36% - 95%)。刘东军

等 (2000) 报道, 利用五头公牛精液分别进行体外受精, 卵裂率分别为 17.6% - 74.7%, 囊胚发育率为 1.0% - 32.6%, 不同个体间差异极显著。本实验证明, 公山羊个体间的差异对体外受精的受精率、卵裂率和桑囊率也有明显影响。

表 6 受精时卵丘存在与否对受精和胚胎发育的影响

Table 6 Effect of cumulus during in vitro fertilization on fertilization and embryo development

卵丘形态 Cumulus morphology	受精卵数/授 精卵数 (%) Fertilized/ inseminated oocytes (%)	发育胚胎数/ 培养胚胎数 (%) Embryo developed/ cultured embryo (%)	
		Embryo developed/ cultured embryo (%)	
		卵裂 Cleaved	桑椹胚(囊胚) Morula (blastocyst)
无卵丘 Completely denuded	24/30 (80.0) ^{a*}	63/96 (65.6) ^a	14/96 (14.5) ^b
部分卵丘 Partially denuded	26/32 (81.1) ^a	62/90 (68.8) ^a	21/90 (23.3) ^a
卵丘完整 Intact	40/49 (84.6) ^a	101/150 (67.3) ^a	33/150 (22.0) ^a

*: 同一列中的不同上角标示差异显著。

Different superscripts within one column differ significantly (One-Way ANOVA, $P < 0.05$).

本实验证明, 附睾尾精子与射出的鲜精受精能力没有明显差异, 部分附睾体精子具有受精能力, 而附睾头精子都没有受精能力。Harayama et al. (1993) 的研究发现, 山羊附睾体和附睾尾精子能发生顶体反应, 但附睾头精子很难发生顶体反应; 附睾体和附睾尾精子的仓鼠卵穿透率分别为 74% 和 93%, 但附睾头精子很少能穿过卵母细胞。Williams et al. (1991) 证明, 虽然绵羊附睾尾精子很容易被钙离子载体 A23187 作用发生顶体反应, 但附睾头精子却不能发生顶体反应, 也不能穿透仓鼠卵。电镜和光镜检测发现, 附睾头、体和尾精子的顶体形态没有差异, 但附睾尾精子比附睾头、体精子在孵育 8 h 后顶体酶的活性更高。上述结果说明, 精子从附睾头到附睾尾运行过程中, 提高了精子顶体反应和与卵质膜融合的能力。

Giedt et al. (1996) 对牛的研究发现, 当把体外成熟时间由 24 h 延长到 28 h, 卵母细胞体外受精后的卵裂率下降, 成熟 24 h 比 28 h 卵母细胞的桑椹胚率高。本实验中, 体外成熟培养 24、27 和 30 h 卵母细胞的受精率差异不显著, 但培养 21 h 卵母细胞的受精率显著低于其它各组。成熟培养

21 h 和 30 h 卵母细胞的桑椹胚/囊胚率显著低于成熟 24 h 和 27 h 卵母细胞。这说明, 未充分成熟和老化的卵母细胞都会对胚胎后续发育产生不利影响。

关于卵丘扩展程度与卵母细胞受精率及胚胎发育之间关系的研究很少, 关于山羊的卵丘扩展与受精和发育的关系还不清楚。本实验发现, 卵丘不扩展的卵母细胞不能受精, 1 级扩展的受精率也较低。扩展好的受精率显著高于扩展不好的卵母细胞, 卵母细胞受精后的胚胎发育能力也是如此。这可能说明, 卵丘扩展程度与卵母细胞质成熟的程度有一定的相关性。本研究中还发现, 即使卵丘扩展不好 (2 级), 卵母细胞仍能排出第一极体, 说明卵丘扩展与卵母细胞核成熟之间相关性很小。孙兴参等 (2002) 对猪的研究也证实了这一点。

实验中发现, 山羊无卵丘卵母细胞在体外可以成熟 (排除第一极体)。无卵丘卵母细胞体外成熟后能够受精, 但是受精率显著低于 1 - 2 层和多层卵丘卵母细胞。成熟前机械去除卵丘严重影响山羊卵母细胞的体外受精率和囊胚发育率。在大鼠 (Vanderhyden and Armstrong, 1989) 和牛 (Zhang et al., 1995; Leibfried-Rutledge et al., 1989), 于成熟培养前去掉卵丘对卵母细胞成熟、受精和胚胎发育都有不利影响。这些结果说明, 成熟培养时卵丘有无对卵母细胞以后的受精和发育影响都很大。其机理有待探讨。

大多数动物在受精时卵母细胞上都还存在一定比例的卵丘细胞 (Yanagimachi, 1994)。在小鼠 (Itagaki and Toyoda, 1991)、仓鼠 (Bavister et al., 1982)、猪 (Kikuchi et al., 1993) 和牛 (Fatehi et al., 2002), 受精时添加卵丘细胞提高受精率。还有一些研究发现, 在牛和绵羊去掉卵丘细胞不影响穿透率, 但是雌雄原核的形成受到损害并伴有较高的多精受精发生 (Behalova and Greve, 1993; Cox, 1991)。然而, Hawk et al. (1992) 却发现, 卵丘细胞对精子穿透有不利影响。本实验结果表明, 在受精前完全去掉或者部分去掉卵丘对受精率和卵裂率没有显著影响, 但受精前完全去掉卵丘对于胚胎的后续发育有严重影响, 桑椹胚/囊胚率显著低于带卵丘卵母细胞。尽管卵丘细胞促进受精的机制还不完全清楚, 但可能是与卵丘细胞能引导精子进入卵母细胞, 诱导获能 (Cox et al., 1993) 和顶体反应 (Chian et al., 1995), 维持精子活力 (Fukui, 1990), 防止透明带变硬 (Katska

et al., 1989) 以及提高精子的穿透力 (Cox et al., 1993; Fukui, 1990) 有关。

总之, 公山羊个体差异、精子成熟程度、卵母细胞成熟培养时间、卵丘扩展程度以及成熟培养和体外受精期间卵丘细胞的有无都是影响山羊卵母细胞体外成熟、受精和胚胎发育的重要因素。因此, 要建立良好的体外生产胚胎系统, 许多问题尚待深入研究。

参考文献 (References)

- Bavister BD, Kinsey DL, Lane M, Gardner DK, 1982. Evidence for a role of post-ovulatory cumulus components in supporting fertilizing ability of hamster spermatozoa. *J. Androl.* 3: 365 - 372.
- Behalova E, Greve T, 1993. Penetration rate of cumulus-enclosed versus denuded bovine egg fertilized *in vitro*. *Theriogenology* 35: 191.
- Chian RC, Okuda K, Niwa K, 1995. Influence of cumulus cells on *in vitro* fertilization of ovine oocytes derived from *in vitro* maturation. *Anim. Reprod. Sci.* 38: 37 - 48.
- Cox JF, 1991. Effect of the cumulus cells on *in vitro* fertilization of *in vitro* matured cow and sheep oocytes. *Theriogenology* 35: 193.
- Cox JF, Hormazabal J, Maria AS, 1993. Effect of cumulus on *in vitro* fertilization of bovine matured oocytes. *Theriogenology* 40: 1 259 - 1 267.
- Crosby IM, Osborn JC, Moor RM, 1981. Follicle cell regulation of protein synthesis and development competence in sheep oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 62: 575 - 582.
- Eppig JJ, Downs SM, 1989. Chemical signals that regulate mammalian oocyte maturation. *Biol. Reprod.* 30: 1 - 11.
- Fatehi AN, Zeinstra EC, Kooij RV, Colenbrander B, Bevers MM, 2002. Effect of cumulus cell removal of *in vitro* matured bovine oocytes prior to *in vitro* fertilization on subsequent cleavage rate. *Theriogenology* 57: 1 347 - 1 355.
- Fukui Y, 1990. Effect of follicle cells on acrosome reaction, fertilization and developmental competence of bovine oocytes matured *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 26: 40 - 46.
- Fukui Y, Sakuma Y, 1980. Maturation of bovine oocytes cultured *in vitro*: relation to ovarian activity, follicular size and the presence or absence of cumulus cells. *Biol. Reprod.* 22: 669 - 673.
- Giedt DW, Rosenkrans CF, Jr, Rorie RW, Rakes JM, 1996. Effects of oocyte maturation length, sperm capacitation time, and heparin on bovine embryo development. *J. Dairy Sci.* 79: 532 - 535.
- Hanada A, 1985. *In vitro* fertilization in goat. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 31: 21 - 26.
- Harayama H, Kusunoki H, Kato S, 1993. Capacity of goat epididymal spermatozoa to undergo the acrosome reaction and subsequent fusion with the egg plasma membrane. *Reprod. Fertil. Dev.* 5: 239 - 246.
- Hawk HK, Nel ND, Waterman RA, Wall RJ, 1992. Investigation of means to improve rates of fertilization *in vitro* of bovine oocytes. *Theriogenology* 38: 989 - 998.
- Hunter AG, Moor RM, 1987. Stage-dependent effects of inhibiting ribonucleic acids and protein synthesis on meiotic maturation of bovine oocytes *in vitro*. *J. Dairy. Sci.* 70: 1 646 - 1 651.
- Itagaki Y, Toyoda Y, 1991. Factors affecting fertilization *in vitro* of mouse eggs after removal of cumulus oophorus. *J. Mammal Ova. Res.* 8: 126 - 134.
- Katska L, Kauffold P, Smorag Z, Duschinski V, Torner H, Kanitz W, 1989. Influence of hardening of zone pellucida on *in vitro* fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 32: 767 - 777.
- Kikuchi K, Nagai T, Motlik J, Shioya Y, Izakie Y, 1993. Effect of follicle cells on *in vitro* fertilization of pig follicular oocytes. *Theriogenology* 39: 593 - 599.
- Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Parrish JJ, First NL, 1989. *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 31: 61 - 74.
- Liu DJ, Chen HW, Brandon M, Xu RG, 2000. Effects of semen from different bulls on *in vitro* fertilization of bovine oocytes. *J. Inner Mongolian University* 31: 307 - 310 (In Chinese).
- Marquant-Le Guienne B, Humblot P, Thibier M, Thibault C, 1990. Evaluation of bull semen fertility by homologous *in vitro* fertilization tests. *Reprod. Nutr. Dev.* 30: 259 - 266.
- Meizel S, 1985. Molecules that initiate or help stimulate the acrosome reaction by their interaction with the sperm surface. *Am. J. Anat.* 174: 285 - 302.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Critser ES, Eyestone WH, First NL, 1986. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 25: 591 - 600.
- Salustri A, Yanagishita M, Hascall VC, 1989. Synthesis and accumulation of hyaluronic acid proteoglycans in the mouse cumulus cell-oocyte complex during FSH induction mucification. *J. Biol. Chem.* 23: 13 840 - 13 847.
- Schoreder AC, Eppig JJ, 1984. The development capacity of mouse oocytes that matured spontaneously *in vitro* is normal. *Dev. Biol.* 102: 493 - 497.
- Sirard MA, Parrish JJ, Ware CB, Leibfried-Rutledge ML, First NL, 1988. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. *Biol. Reprod.* 39 (3): 596 - 552.
- Sun XS, Yue KZ, Ma SF, Liu ZH, Liu Y, Tan JH, 2002. Relationship between cumulus expansion and nuclear maturation in pig oocytes. *Scientia Agricultura Sinica* 35: 85 - 88 (In Chinese).
- Sun XS, Yue KZ, Ma SF, Li JL, Zou Y, Tan JH, 2003. The Effect of pre-incubation of porcine COCSs in medium without gonadotropins on the chromatin configuration and quality of oocytes matured *in vitro*. *Acta Zool. Sin.* 49: 86 - 90 (In Chinese).
- Vanderhyden BC, Armstrong OT, 1989. Role of cumulus cells and serum on the *in vitro* maturation, fertilization and subsequent development of rat oocyte. *Biol. Reprod.* 40: 720 - 728.
- Williams RM, Graham JK, Hammerstedt RH, 1991. Determination of the capacity of ram epididymal and ejaculated sperm to undergo the acrosome reaction and penetrate ova. *Biol. Reprod.* 44: 1 080 - 1 091.
- Yanagimachi R, 1994. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD ed. *The Physiology of Reproduction*. 2ed edn. New York: Raven Press, 178 - 317.
- Younis AI, Zuelke KA, Harper KM, Oliveira MA, Brackett BG, 1991. *In vitro* fertilization of goat oocytes. *Biol. Reprod.* 44: 1 177 - 1 182.
- Zhang L, Jiang S, Wozniak PJ, Yang XZ, Godke RA, 1995. Cumulus cell function during bovine oocyte maturation fertilization and embryo development *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 40: 338 - 344.
- 刘东军, 廖洪武, Mal Brandon, 旭日干, 2000. 不同种公牛精液对牛卵母细胞体外受精效果影响的研究. *内蒙古农业大学学报* 31: 307 - 310.
- 孙兴参, 岳奎忠, 马所峰, 刘忠华, 刘颖, 谭景和, 2002. 猪卵丘扩展与卵母细胞核成熟关系的研究. *中国农业科学* 35: 85 - 88.
- 孙兴参, 岳奎忠, 马所峰, 李家琳, 邹义, 谭景和, 2003. 前培养对猪卵母细胞生发泡染色质构型和体外成熟的影响. *动物学报* 49: 86 - 90.