

# 谷胱甘肽(GSH)对牛卵母细胞体外受精胚胎发育的影响

魏红芳<sup>1</sup>, 张长兴<sup>1</sup>, 管林森<sup>2</sup>, 徐照学<sup>3</sup> (1. 郑州牧业工程高等专科学校, 河南郑州 450011; 2. 西北农林科技大学动物科技学院, 陕西杨凌 712100; 3. 河南省农业科学院畜牧研究所, 河南郑州 450002)

**摘要** [目的]研究谷胱甘肽(GSH)对牛体外受精胚胎发育的影响。[方法]通过对牛卵母细胞进行体外受精和受精卵体外培养,研究了谷胱甘肽(GSH)对牛胚胎体外发育的影响。[结果]添加谷胱甘肽组的桑囊率分别比对照组高3.34%和2.26%,囊胚发育率分别比对照组高4.57%和4.05%,但差异不显著( $P>0.05$ )。[结论]GSH在牛体外受精的胚胎发育过程中有一定的保护和促进作用。

**关键词** 牛; 体外受精; 谷胱甘肽(GSH)

中图分类号 S823 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)33-16398-01

## Effect of GSH on the Development of IVF Embryos of Bovine Oocytes

WEI Hong-fang et al (Zhengzhou College of Animal Husbandry and Engineering, Zhengzhou, Henan 450011)

**Abstract** [Objective] The research aimed to study the effect of GSH on the development of bovine *in vitro* fertilization (IVF) embryos. [Method] Through IVF and *in vitro* culture of zygote, the effects of GSH on the development of bovine embryos *in vitro* were studied. [Result] The morula rate in the groups of adding GSH were higher 3.34% and 2.26% resp. than control group. The blastocyst development rates were higher 4.57% and 4.05% than control group, without significant difference ( $P>0.05$ ). [Conclusion] GSH had certain protective and promotion effects on the development of bovine IVF embryos.

**Key words** Bovine; IVF; GSH

谷胱甘肽(GSH)是一种生物体内应用的抗氧化物,主要存在于动物组织和血液中。它在细胞中的功能之一就是抵御各种毒素和致癌剂,除作为抗毒剂外,谷胱甘肽还对一些巯基酶有激活作用,可作为保护酶和其他蛋白巯基的抗氧化剂,在生物氧化、氨基酸转运、保护血红蛋白过程中起一定作用。体外培养液中添加GSH对小鼠、牛、山羊胚胎发育的促进作用都有报道<sup>[1-2]</sup>。笔者通过对牛进行体外受精(IVF)和受精卵体外培养进行相关研究,证明培养液中添加谷胱甘肽对牛卵母细胞体外受精胚胎发育的作用。

## 1 材料与方 法

**1.1 卵巢的采集与保存** 卵巢从郑州市东郊弓马庄清真屠宰场采集。黄牛被屠宰剖腹后,立即无菌采集卵巢,刺破特大卵泡,剪掉多余的脂肪组织,将卵巢用灭菌吸水纸擦净,投入35~39℃且加有适量青、链霉素的灭菌生理盐水中保存,3h内送回实验室。

**1.2 卵泡卵母细胞的采集与成熟培养** 用装有12号针头的10ml注射器抽吸卵巢表面直径为2~6mm的卵泡细胞,将抽吸物缓缓注入10ml刻度离心管底部,静置5min后,抽吸离心管底部沉淀物,注入培养皿中,用洗卵液稀释,在实体显微镜下检取卵丘-卵母细胞复合体(COC)。选择A、B级卵母细胞,将其先用洗卵液(含1mg/ml BSA的BO液)洗3次,再用成熟培养液洗3次后,进行微滴(100μl/滴)培养23~24h(10~20个卵母细胞/滴)。培养条件为5%CO<sub>2</sub>,39℃,饱和湿度(以下均同)。成熟培养前2h孵育溶液。

**1.3 牛精子体外获能及体外受精** 取10ml灭菌离心管1支,先加入45% Percoll液2ml,然后贴管壁缓缓加入30% Percoll液2ml,最后将解冻的牛精液(1ml)缓缓加到Percoll分层液上,1500r/min离心10min,吸弃上清液,剩约80μl精子,用精子获能液调整精子浓度为 $2 \times 10^7 \sim 4 \times 10^7$ 个/ml,备用。

将体外培养成熟的卵丘-卵母细胞复合体(COC)用洗卵液洗涤2~3次,洗涤过程中将卵母细胞周围包裹的颗粒细胞用吸尿管去除一部分,然后用受精液洗涤3次,按10~20个/滴移入受精液微滴(预孵时只作90μl的液滴)。然后于90μl受精液滴中加入10μl经过获能处理的精液,置于CO<sub>2</sub>培养箱共同孵育6~8h。

**1.4 受精卵的体外发育培养** 将受精卵按10~20个/100μl移入制备好的颗粒细胞单层上进行共同培养,每隔24h半量更换培养液。胚胎早期培养体外操作过程中,分别于IVF后第2、6、7天(48、144、168h)统计卵裂率、桑椹胚和囊胚发育率。

## 2 结果与分析

将采集到的卵泡-卵母细胞分成3组,对照组采用添加10% ECS的TCM-199液(记为①组);试验组在对照组的基础上添加0.5或1.0μg/ml GSH(分别记为②组、③组);体外成熟培养23~24h后,用Percoll分层液法处理的精子进行体外受精,授精后6~8h将受精卵分别移到添加有0.5和1.0μg/ml GSH的成熟培养液(TCM-199+10% ECS)与颗粒细胞单层共同培养。授精后48h统计卵裂率,并吸弃未分裂的单细胞;授精后168h统计桑椹胚和囊胚的发育率(表1)。

表1 GSH对卵母细胞体外受精后发育的影响

Table 1 The effects of GSH on the development of IVF oocytes

组别 Group	培养卵母 细胞数 Number of cultured oocytes	卵裂率//% Cleavage rate	桑囊率//% Blastocyst rate	囊胚率//% Blastula rate
①	243	57.20(139/243) <sup>a</sup>	29.50(41/139) <sup>a</sup>	22.30(31/139) <sup>a</sup>
②	232	57.76(134/232) <sup>a</sup>	32.84(44/134) <sup>a</sup>	26.87(36/134) <sup>a</sup>
③	256	57.81(148/256) <sup>a</sup>	31.76(47/148) <sup>a</sup>	26.35(39/148) <sup>a</sup>

注:表内括号内数据为试验测得原始数据;同列小写字母表示在0.05水平的差异显著性。

Note: The data in brackets are the original data tested in the experiment. Different small letters in the same column mean significant difference at 0.05 level.

作者简介 魏红芳(1975-),女,陕西凤县人,硕士,讲师,从事动物繁殖方面的教学与科研工作。

收稿日期 2009-07-17

(下转第16404页)

草,即炭化去除杂草。

**3.2 手工分拣** 疵点毛只有从正常的羊毛中分拣出来,才便于针对性地处理和使用。从原毛包中取出的套毛最接近于羊毛原始状态,是识别各种疵点毛的最好时机。否则进入加工后,原毛中的各类疵点毛将扩散和正常羊毛混合起来,再拣出就十分困难,也给后序工作带来麻烦。

识别和剔除各类疵点毛是选毛工序的一项重要内容。对后工序造成严重危害的疵点毛必须加以剔除,如按正常工艺难以处理的密集草刺毛、毡片毛、套毛上呈密集状态的粗死毛、印记毛及选毛时发现的毛布袋皮碎屑、皮块毛、圈黄毛等。但并非所有的疵点毛都要剔除,如强力较小的弱毛或不太明显的弱节毛只需掌握其情况以便配毛时心中有数。严重的弱节毛最好分拣出来,以便严格控制搭用比例,或降为粗纺使用。

**3.3 人工处理** 选毛时分拣出来的疵点毛必须经处理才能使用。主要处理方法有:剪去密集草刺、剪去毛上的皮块、剪去印记毛上的印记、用弹毛机处理硬毡片毛或超期剪毛、严重含杂草的毛加以炭化处理等。散毛炭化的缺点是重量损耗大,约损失7%~8%,工序长,纤维强力和手感都受到化学损伤;优点是去除杂草极为有效,尤其是消除机械除草难以完全排除的细碎叶屑。织成坯布后炭化会影响织物的手感,因此应根据产品不同用途采用不同的炭化方式处理。

**3.4 疵点毛的合理使用** 缺陷是相对于产品用途和要求而言的,可根据缺陷的不同,因地制宜地使用疵点毛。如原毛中的圈黄毛、色花毛可用于深色色号和夹花色号的产品;在

不影响产品质量的前提下,疵点毛可适当地掺入正常毛中使用,但要掌握掺入比例;分拣出来的严重缺陷的毛即使限制掺用比例仍可能影响质量的,要降级使用,如特别严重的脆弱毛、头脚毛、粗死毛积聚到一定的数量后从精纺用毛降为粗纺用毛。总之,要兼顾产品的品质要求和原毛质量的实际状况,制定用毛原则,达到经济合理,降低成本。

#### 4 结语

疵点毛的产生原因有多种,主要是管理粗放。因此,应从绵羊饲养环节避免疵点毛的产生,如喂饲优质饲料;保持羊舍或棚圈干燥清洁,勤换垫草,选择干燥地方卧盘;预防疥癣病等的发生;避免在有害刺果的草场放牧;提高剪毛技术;用可洗去的物质对羊只进行标记等。

生产企业对疵点毛不应一概拒收,应采取有效措施对疵点毛进行处理,使之成为某些要求不高产品的原料加以利用。要分拣出密集草刺毛、毡片毛、套毛上呈密集状态的粗死毛、印记毛及选毛时发现的毛布袋皮碎屑、皮块毛、圈黄毛等疵点毛,进行人工处理。人工处理主要有剪去密集草刺、剪去毛上的皮块、剪去印记毛上的印记、用弹毛机处理硬毡片毛或超期剪毛、严重含杂草的毛加以炭化处理等方法。

#### 参考文献

- [1] 李连任.羊毛疵点及预防方法[J].当代畜禽养殖业,1996(3):18.
- [2] 赵国志.羊毛的疵点及其预防办法[J].中国纤检,2004(12):27,32.
- [3] 杨菊清.弱节毛的辨别与计价办法[J].当代畜禽养殖业,1995(4):17-18.
- [4] 陈胜利.缺陷羊毛的产生与预防[J].河北农业科技,2005(4):35.

(上接第16398页)

由表1可以看出,添加GSH的试验组与对照组在卵裂率、桑囊率和囊胚发育率上差异均不显著( $P>0.05$ );但第②组和第③组的桑囊率分别比第①组高3.34%和2.26%,囊胚发育率分别比第①组高4.57%和4.05%。

#### 3 讨论

胚胎代谢过程产生的反应氧(ROS)能改变细胞内的一些分子,对胚胎发育有阻滞或延迟效果,自然情况下,胚胎细胞有多种保护氧化作用的机制,卵泡或生殖道内有次牛磺酸,牛磺酸以及维生素C等物质,这些非酶性物质对胚胎发挥外部抗氧化效应。细胞内的抗氧化作用主要通过一些抗氧化酶来实现,卵母细胞及胚胎细胞内都有过氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶、谷氨酰半胱氨酸合成酶等物质的转录本的贮存,这些物质对胚胎的正常发育是不可缺少的<sup>[3]</sup>。GSH在体外培养时对牛、山羊胚胎发育的保护和促进作用主要发生在8~16细胞期的发育中。GSH的作用可能依赖于BSA或其他蛋白质间接发挥,BSA有酶性抗氧化活性,GSH可能会为BSA保护这种抗氧化活性提供一种还原性能力。GSH还会增加胚胎对温度升高的耐受性,这种保护

作用对移植后胚胎的存活和发育有重要价值,因为着床期子宫的高温压力会提高胚胎死亡的可能性。该试验参考TCM-199中谷胱甘肽的含量,在成熟培养液和胚胎早期培养液中分别添加0.5 μg/ml(第②组)和1.0 μg/ml(第③组)的谷胱甘肽,与对照组相比,桑囊率和囊胚发育率都比不添加GSH的对照组(第①组)有所提高,但差异不显著。这表明,GSH在牛体外受精的胚胎发育过程中有一定的保护和促进作用。这与Lee等的报道一致<sup>[4]</sup>,或许是因为GSH的添加量不够合适以及对它的作用机理还不十分清楚,才导致促进效果不明显,对于GSH对牛胚胎体外发育能力的促进作用还需进一步研究。

#### 参考文献

- [1] 钱云,丁家桐,刘红林.卵母细胞成熟的形态学特征及其调控[J].国外畜牧科技,1999,26(6):26-30.
- [2] SLAWETA R, LASKOWSKA T. The effect of glutathione on the motility and fertility of frozen bull sperm[J]. Anim Reprod Sci, 1987, 13: 249-253.
- [3] 张靖飞,李裕强,刘月凤.动物胚胎体外培养研究进展[J].动物科学与动物医学,2002,19(2):19-22.
- [4] LEE J H, PARK J H, CHOI K M, et al. Improvement of in vitro development of bovine embryos in a medium containing selenium[J]. Asian-Aust J Anim Sci, 2001, 14(2): 170-173.