

猪卵母细胞体外成熟技术研究进展

项智锋 李艳 王清华 (河南科技学院动物科学学院, 河南新乡 453003)

摘要 猪卵母细胞体外成熟(IVM)为猪胚胎的体外生产及相关胚胎工程技术如胚胎细胞和体细胞核移植、转基因和性别控制提供了廉价原料,是现代胚胎工程技术的热点之一。多年来科研人员为了进一步提高卵母细胞体外培养成熟率以及更深入地了解卵母细胞成熟机制,对影响卵母细胞体外成熟的因素进行了大量的研究。综述了影响猪卵母细胞体外成熟的相关因素。

关键词 体外成熟; 卵母细胞; 胚胎工程

中图分类号 S814.6 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2006)21-5556-03

猪卵母细胞体外成熟培养技术是现代生物技术中的重要内容之一。猪卵母细胞体外成熟是体外受精、性别控制、核移植技术等成功与否的前提和关键。最早进行哺乳动物卵母细胞培养的是Arcus和Erzmann,他们从兔卵巢中取出未成熟卵母细胞进行培养,并且获得了成功。自从1965年Edwards首次将小鼠、绵羊等动物的卵母细胞在体外培养成熟后,科研人员对多种哺乳动物卵母细胞的成熟培养及成熟过程进行了深入的研究,以期能获得更高的卵母细胞成熟率。笔者结合国内外学者的相关研究,对影响猪卵母细胞体外成熟培养的有关因素进行了综述。

1 猪的品种

猪的不同品种,其卵母细胞质量不同,体外成熟培养效果不同,如瘦肉型猪与非瘦肉型猪,巴马香猪与本地猪,外国品种与国内品种。即便是国内不同省份的品种,也可能因遗传背景、特定营养环境、气候条件的不同造成品质上的差异,导致卵母细胞质量的差异。

2 猪的年龄及健康状况

近几年的研究发现,经产母猪卵母细胞在成熟率及胚胎发育能力方面明显优于青年母猪^[1]。处于不同的发育阶段如仔猪、处女猪、经产猪、老母猪能够影响猪胚胎体外生产的效率,不同年龄的猪也会影响卵母细胞成熟培养的效果。因为,其卵巢外观不同,抽取的卵母细胞成熟培养效果也不同。有的育龄盛期的母猪,其卵巢较大,有黄体,颜色较深,表面卵泡多而且大卵泡比例高,获得的卵母细胞细胞质较均匀。而有的猪的卵巢很小,还没有黄体,颜色很浅,都是极小的卵泡,获得的卵母细胞细胞质不太均匀,局部有较多稀薄空洞结构。如果卵巢质量好,卵母细胞质量就好,体外成熟也较好。猪的健康状况也影响猪卵母细胞体外成熟。健康母猪的卵母细胞,体外成熟效果好,而源于老弱病残母猪的卵母细胞体外成熟效果差。

3 猪的性周期阶段

卵巢所处不同性周期阶段如无黄体期时卵母细胞体外成熟率优于黄体期和黄体前期卵巢上卵母细胞成熟率。郭宪等^[2]的试验结果证明:无黄体期卵母细胞成熟率(69.2%)高于黄体期(64.3%),但两者差异并不显著,说明卵巢性周期阶段对猪卵母细胞成熟有影响,但影响不大。原因可能是在体外成熟培养时所选用的卵丘-卵母细胞复合体都是胞

质均匀、卵丘层2层以上,卵母细胞在体内发育的阶段相似,因此无黄体期和黄体期两者无显著差异。

4 卵巢保存温度及时间

卵巢长时间在体外环境中保存,会阻碍蛋白质的合成,并抑制卵母细胞生发泡破裂,延迟卵母细胞的成熟。因此从屠宰场获取的卵巢,要用0.9%的生理盐水或含抗生素的磷酸缓冲液保存在尽可能短的时间内运回实验室。卵巢的保存温度及贮存时间影响卵母细胞的体外成熟。Walter和Graves研究了不同保存温度(5、16、25、30和37℃)及不同贮存时间(2、6、10、14和26h)对猪卵母细胞体外成熟的影响,发现不管采用哪种温度,随着贮存时间的延长,卵母细胞的成熟率下降^[3]。而Abeydeera认为采用25℃运输,5h内对卵母细胞成熟及发育能力没有影响^[4]。一般认为卵巢自体内取出后,采用25~37℃贮存,短时间内将卵巢运回实验室对卵母细胞体外成熟影响不大。

5 卵母细胞采集方法

卵母细胞的采集方法有抽吸法和切割法。在从离体卵巢上采集卵母细胞时,因采集方法不同,所得卵母细胞体外成熟率间存在一定的差异,如抽吸法成熟率(77.6%)低于切割法(80.4%)。抽吸法和切割法相比两者各有优缺点。与抽吸法相比,切割法虽然费时,但极少破坏卵丘-卵母细胞复合体(COGs),这种采集方法更有利于COGs的生长发育^[5]。注射器抽取有腔卵泡比用刀片割破所取卵母细胞较少,但是符合取卵时间愈短愈好的原则,因其方便、干净、简捷被普遍使用。但要注意选择合适的注射器和针头。通常10ml注射器加18号针头是比较合适的。实践发现10ml注射器实用性比5和20ml的好,抽取卵泡的速度也比较快,特别是针头的大小非常重要。针头太大,卵母细胞流失很多,没有足够数量的卵母细胞进行实验;针头太小则抽取过程中卵丘细胞会大量的脱落,因为卵丘细胞对卵母细胞有重要的协同作用,卵丘细胞的脱落将不利于卵母细胞的体外成熟。

6 卵泡的直径

哺乳动物的卵巢上存在2种卵泡,一种为有腔卵泡,另一种为腔前卵泡。已有研究表明,腔前卵泡卵母细胞的体外成熟率(26.1%)显著低于有腔卵泡卵母细胞的体外成熟率(83.0%)。由于RNA的早期合成和积蓄是卵母细胞成熟分裂和早期胚胎发育的物质基础,小腔卵泡卵母细胞成熟率低于一部分正进行RNA的合成、未能适时适量地合成某些参与调控成熟分裂恢复的蛋白因子有关,而大卵泡内已存了足够的RNA以合成蛋白质且大腔卵泡卵母细胞处于快速生长后期,细胞内转录已完成,在体外具有自发核成熟能力,故成

基金项目 河南科技学院引进人才基金项目。

作者简介 项智锋(1978-),男,湖北武穴人,硕士,助教,从事动物胚胎工程研究。

收稿日期 2006-06-07

熟率高。卵母细胞只有达到一定体积才具有恢复减数分裂的能力,来自小腔卵泡的卵母细胞在核成熟方面存在缺陷,故有腔卵泡直径大小对猪卵母细胞体外成熟和发育也有影响。Yoon 等^[6]研究发现,来自3~8 mm 直径卵泡的卵母细胞成熟率显著高于小于3 mm 的卵泡卵母细胞(91%~58%)。韩毅冰等^[7]也证明小直径卵泡卵母细胞(<1~2 mm)成熟率不如大直径卵泡卵母细胞(2~6 mm)。通过对不同大小卵母细胞和来自不同卵泡的卵母细胞体外培养发现,卵母细胞大小对穿卵率无影响,但卵泡大小同穿卵率正相关^[8]。

7 卵丘卵母复合体类型

在卵母细胞体外成熟研究中,一般根据卵母细胞周围包绕卵丘细胞的情况,分为4种类型:即包绕3层以上紧密卵丘细胞的卵母细胞为第1类;3层以下的为第2类;卵丘细胞扩展而疏松,卵母细胞卵质无斑块的为第3类;无卵丘细胞的卵母细胞(裸卵)为第4类。李丽立等^[9]对这4类卵母细胞体外成熟研究结果表明,达到MI期的成熟率分别为93%、90%、76%、20%,成熟效果依次递减。因为在哺乳动物卵母细胞成熟研究中发现,处于静止期的初级卵母细胞在激素的作用下,若没有卵丘细胞的存在则卵母细胞不能成熟。可见在卵母细胞成熟发育时卵丘细胞直接向卵母细胞发出成熟发育信息。卵丘细胞对卵母细胞有着重要的协同作用,所以卵丘的完整性和卵丘细胞包绕情况对卵母细胞成熟具有重要的作用。因此,在进行猪胚胎体外生产时多选择卵母细胞胞质均匀、透明带完整、具有3层或3层以上卵丘细胞的COGs进行培养^[4]。

8 卵母细胞体外培养条件

8.1 气相条件 目前,卵母细胞常用的培养气相有2种,一种是5%CO₂,5%O₂,90%N₂;另一种是5%CO₂,95%的空气。在这2种气相中,CO₂的含量十分关键。因为培养体系内CO₂不仅可以平衡培养基,而且还有助于细胞代谢中的丙酮酸转换成草酰乙酸,有利于细胞成熟。多数培养基在配制前都已将pH值调好,并具有一定的缓冲能力,5%CO₂则刚好是维持pH所必需的。

8.2 培养时间 其他哺乳动物卵母细胞体外成熟培养时间通常是22~24 h。但是猪比较特殊,通常需要48 h左右才能达到核成熟,在24 h的核成熟率几乎为零,而且从30 h左右到72 h,核成熟率几乎是随着培养时间的增加而直线上升。虽然延长培养时间可以使核成熟率逐步增高,但是猪的卵母细胞会逐渐老化,因此在保证一定的核成熟率的前提下,有必要缩短猪卵母细胞体外成熟培养时间。体外培养是建立于猪卵母细胞在促黄体素(LH)峰值出现后36~42 h达到成熟这一基础上。目前国内多采用48 h,世界首例转基因克隆猪的成熟培养时间选择42~44 h。

8.3 培养温度和湿度 在体外成熟(IVM)时采用的是饱和湿度,目的是减少培养基的水分蒸发,维持培养基中各种物质的浓度,保持渗透压。各种物质浓度的变化及渗透压的变化会造成猪卵母细胞的生发泡破裂。因此,通常在培养基上面覆盖一层石蜡油或矿物油,以使在培养箱内或离箱操作时维持培养基的气相、湿度及pH值。但Shimada等^[10]研究发现,石蜡油或矿物油对类固醇激素具有吸附作用,延迟卵母

细胞的成熟以及降低胚胎发育能力,并认为石蜡油或矿物油可能含有对卵母细胞生长不利的物质。

不同动物卵母细胞最适宜培养温度不同,但是卵母细胞体外成熟的最佳温度应是动物的体温。一般来说,稍高一点的温度对细胞易造成损害,而稍低于体温的温度对体外成熟似乎无甚影响。目前,猪卵母细胞IVM时采用的温度为38.5~39。为保持培养的气相、湿度、温度的相对稳定,将培养皿或培养板置于培养箱的内部,可以一定程度地缓解由于其他操作打开CO₂培养箱对卵母细胞培养产生的不利影响。

8.4 培养体系

8.4.1 基础培养基。卵母细胞体外成熟的基础培养基有2种:一种是含有能量物质的简单盐溶液培养基,如Witten medium;另一种是复合型组织培养基,含氨基酸、维生素、核酸前体等物质,成分复杂,如TCM199^[11]。培养基要求pH值在7.2~7.4,渗透压在260~320 mosm/kg,偏离此范围对卵母细胞生长是有害的。目前大多数学者采用TCM199和NCSU23。虽然这2种培养基在卵母细胞成熟率上差异不显著,但受精后胚胎发育能力NCSU23培养基占明显优势^[12]。

8.4.2 激素。在体内,卵母细胞胞质的成熟过程受激素水平的调节,排卵前促性腺激素峰可以通过颗粒细胞诱导卵母细胞成熟,并引起卵丘细胞扩散。因而促性腺激素水平的变化对卵丘细胞的分泌功能具有一定的调节作用,卵丘细胞受激素作用的时间由此也可能直接或者间接地影响卵母细胞的核和胞质的成熟。促性腺激素被认为对成熟的启动发挥重要作用,一般成熟培养液都要添加。目前,成熟培养液中使用较多的促性腺激素是FSH和LH。FSH和LH作用于生长至一定程度的卵泡时,可使卵丘细胞扩散,中断与卵母细胞之间的联系,使卵丘细胞的信息不能传入卵母细胞,从而解除了卵丘细胞对卵母细胞恢复减数分裂的抑制作用,使卵母细胞减数分裂重新启动。虽然FSH和LH在猪卵母细胞体内成熟和排卵中起重要作用,但似乎PMSG、hCG对促进体外成熟更为有效。早期研究中,促性腺激素存在于整个培养过程,但是蔡令波等^[13]的研究表明,在猪卵母细胞IVM时,培养前20 h加入PMSG、hCG、雌二醇(E₂),而在培养后20 h去除,可增加卵母细胞的成熟率,促进卵母细胞减数分裂和胞质成熟。因此,目前绝大多数研究者都采用了此方案。但对类固醇激素的使用目前还存在争议。Margot等^[14]通过研究发现培养过程中添加雌激素、孕酮等类固醇激素对COGs的体外成熟无影响,COGs培养时能自身合成和分泌上述激素,满足卵母细胞生长需要,因此建议在培养过程中无需加入类固醇激素。

8.4.3 呤类。环-磷酸腺苷(cAMP)在哺乳类生长完全的卵母细胞的减数分裂抑制中起着非常重要的作用。研究表明次黄呤、腺呤核苷酸在体外和体内均可抑制卵母细胞的减数分裂。腺呤核苷酸可能通过不同形式的作用影响cAMP的代谢来调节卵母细胞的减数分裂,其主要途径有2条:一是通过磷酸化生成ATP,然后再经腺苷酸环化酶的作用转化为cAMP,使细胞内cAMP水平升高;二是刺激卵母细胞表面的腺苷酸环化酶的活性,提高细胞内cAMP水平,达到对卵母细胞成熟的抑制。次黄呤除通过调节cAMP的代谢

外还可通过影响鸟苷的产量而实现对卵母细胞的成熟抑制^[15]。

8.4.4 Ca^{2+} 。卵母细胞成熟之前促成熟因子(MPF)以无活性的形式存在,在某些信息作用下,细胞内 Ca^{2+} 水平升高,结合并激活钙离子载体(CaM),形成 Ca^{2+}/CaM 复合物,使MPF处于激活状态,进而促进卵母细胞的成熟分裂。Carroll和Swam报道,去除培养液中的 Ca^{2+} 或加入 Ca^{2+} 通道阻断剂均可抑制猪卵母细胞极体的形成。

8.4.5 血清。血清成分十分复杂,含激素、生长因子、细胞因子、氨基酸、酯类、维生素等物质。血清对卵母细胞体外成熟的作用,主要是由于血清能为COGs提供所需的蛋白质,或者是由于血清与卵母细胞一起能够防止透明带变硬,从而有利于精子的穿入。在卵母细胞培养时常用的血清种类有胎牛血清(FCS),发情牛血清(ECS)和新生犊牛血清(NCS),但以FCS应用最广泛。蔡令波等^[13]报道,ECS较NCS更有利于猪卵母细胞体外成熟,并认为可能是ECS比NCS含有更高促性腺激素、类固醇激素浓度的缘故。也有学者添加同种动物血清进行实验,成国祥等就指出,发情山羊血清较FCS更有利于山羊卵母细胞的体外成熟。虽然Wu J等^[16]在进行猪腔前卵泡和有腔卵母细胞培养时采用了猪血清,但猪血清跟其他动物血清在促进成熟方面进行比较的报道较少。添加血清虽能普遍提高卵母细胞的体外成熟率,但血清有其固有缺点,如一些特性未明成分能够吸附激素、维生素、脂肪酸以及金属离子,而且还可能存在抗精子抗体,易被支原体污染等。近几年来,由于无血清培养体系化学成分明确,能够消除因血清质量及不明成分等带来的不确定因素,便于分析促进卵母细胞成熟的物质,因此研究较为活跃^[17]。

8.4.6 卵泡液。猪卵泡液(PFF)是猪卵母细胞体外成熟的主要环境,它是卵泡中血清渗出物经过新陈代谢活动改变过的产物,包含有特殊成分,如卵泡壁细胞合成的类固醇和糖蛋白。卵泡液对卵母细胞生长发育有促进作用。Yashida等^[18]报道在培养基中添加猪卵泡液可显著提高猪卵母细胞的核成熟率、正常受精率及卵裂率,并发现一种分子量在10 000~200 000 Da的酸性物质促进了卵母细胞成熟。Vatzis等^[19]研究认为,冷冻卵泡液在促进卵母细胞的成熟、降低多精受精方面优于新鲜卵泡液,并提出冷冻可能使某些促进卵母细胞成熟的物质激活或抑制某些对卵母细胞生长不利的物质。但有的学者报道,在成熟过程中添加卵泡液对卵母细胞的核成熟及卵裂率无影响,只提高桑葚胚的形成率。由于卵母细胞在体外具有自发成熟的现象,暗示卵泡液中可能含有抑制卵母细胞成熟的物质,这些物质只是在某些阶段才被去除或抑制。已有的研究表明,次黄吟(HX)是卵泡液中能够抑制成熟的主要成分。苏有强等^[20]证明HX能可逆性地抑制猪卵母细胞的体外成熟,且该作用具有剂量依赖性。但无论如何,在培养过程中添加卵泡液对促进卵母细胞成熟及提高胚胎发育能力的作用已得到肯定。

8.4.7 颗粒细胞。卵母细胞周围的颗粒细胞分泌卵母细胞成熟抑制因子(OM),具有抑制卵母细胞的自发成熟作用,但其作用与细胞浓度有关。低浓度的颗粒细胞($1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ / ml)在促性腺激素或发情牛或绵羊血清存在的情况下能

够刺激成熟分裂复始;高浓度的颗粒细胞($5 \times 10^6 \sim 100 \times 10^6$ / ml)则抑制成熟分裂的复始。

8.4.8 生长因子和细胞因子。在基础培养基中添加生长因子,如胰岛素、表皮生长因子、转化生长因子等对卵母细胞的生长、成熟起重要的调节作用。如表皮生长因子是一种卵泡卵母细胞成熟的诱导剂,能促进卵母细胞的体外成熟。Huttel等^[21]发现,30 μ L的表皮生长因子有利于卵母细胞的体外成熟,使达到第二次减数分裂中期的卵母细胞达到97%。

9 其他物质

现以证明,成熟液中添加Cysteine^[20]、L-Cysteine、BME(β-mercapthional)^[22]和AA-2-G(Ascorbic Acid 2-O-2-Glucoside)^[23]能有效地促进卵母细胞胞质成熟,有利于胚胎生长发育。但为了探讨更好的成熟体系,许多研究者还采取延迟减数分裂启动的方法,以使卵母细胞核、胞质成熟同步化,增加成熟率。二丁基环一磷酸腺苷 dbcAMP为其中研究较多的一种。dbcAMP为减数分裂的抑制物,能延长生发泡期,促进卵母细胞生发泡破裂同步化,因此在培养后期去除可以显著提高卵母细胞成熟率^[23]。

10 结语

卵母细胞的成熟是一个复杂的动态的过程,有许多代谢事件发生,除了进行积极的mRNAs转录、蛋白质合成外,还有其他一些物质的降解。卵母细胞的成熟包括胞质的成熟和细胞核的成熟2个方面。在体外成熟培养中,通常也以第1极体的排出来判断卵母细胞的成熟,其实这只是核成熟的标志。只把核成熟作为判断卵母细胞体外成熟的标志,严格来讲是不全面的。因此除了核成熟外,卵母细胞的胞质成熟也很重要,尤其是对用于核移植的卵母细胞而言。胞质的成熟直接关系到能否使供体核实现彻底的再程序化,重构胚能否维持正常的分裂发育。从这个意义上说,目前所用的卵母细胞成熟体系还不尽完善,一些对卵母细胞成熟和后续发育非常重要的物质不能完全合成。而影响猪卵巢卵母细胞体外成熟的因素很多,使得这一技术在应用时存在一定的难度和问题。如何建立更佳的体外培养体系以提高卵母细胞的受精率及胚胎发育能力将是以后研究的重点。

参考文献

- [1] HYUN H, LEE G S, KIM D Y, et al. Effects of maturation media and oocyte derived from sows or gilts on the development of cloned pig embryos[J]. Theriogenology, 2003, 38(5): 15-16.
- [2] 郭宪, 陈学进, 叶荣, 等. 牛卵巢卵母细胞体外成熟的研究[J]. 甘肃农业大学学报, 2004(5): 503-507.
- [3] WALTERS E M, GRAVES C N. Transportation and storage effects on porcine ovaries[J]. J Anim Sci, 1998, 76: 69-72.
- [4] ABEYDEERA L R. In vitro production of embryos in swine[J]. Theriogenology, 2002, 57: 252-273.
- [5] 陈晓宇, 刘东, 李青旺, 等. 猪卵巢卵母细胞的收集和体外成熟培养[J]. 云南畜牧兽医, 2002(4): 39-41.
- [6] YOON K W, SHINTY, PARK J I, et al. Development of porcine oocytes from preovulatory follicles of different sizes after maturation in media supplemented with follicular fluids[J]. Reprod Fertil Dev, 2000, 12: 133-139.
- [7] 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能力[J]. 中国兽医学报, 2002(20): 183-187.
- [8] LUCAS X, MARTINEZ E A, ROCA J, et al. Influence of follicle size on the penetrability of immature pig oocytes for in vitro penetration assay[J]. Theriogenology, 2003, 60: 659-667.
- [9] 李丽立, 王芳. 现代生物技术与畜牧业[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 10-12.

(上接第5558 页)

- [10] SHIMADA M, KAWAN N, TERADA T. Delay of nuclear maturation and reaction in developmental competence of pig oocytes after mineral overlay of in vitro maturation media[J]. *Reproduction*, 2002, 124 :557 - 564.
- [11] 王海, 曾申明, 朱士恩, 等. 培养介质、卵丘细胞和卵泡直径对猪卵母细胞体外成熟的影响[J]. *中国畜牧杂志*, 2002, 38(5) :15 - 16.
- [12] 叶华虎, 魏泓, 陈紧顾. 猪卵母细胞在不同培养液中成熟后的发育能力[J]. *第三军医大学学报*, 2003, 25(6) :511 - 513.
- [13] 蔡令波, 王锋. 猪卵母细胞体外成熟与冷冻保存的初步研究[J]. *南京农业大学学报*, 2002, 25(4) :116 - 118.
- [14] MARGOT ALVES, CHARLES GRAVES. Involvement of steroid hormones on in vitro maturation of pig oocytes[J]. *Theriogenology*, 2002, 57 :811 - 821.
- [15] 黄志坚, 黄依明. 牛体外受精技术研究进展[J]. *福建畜牧兽医*, 2002 (1) :56 - 58.
- [16] JI WU, BENJAMIN, DONGLAS CARREA. In vitro growth, maturation, fertilization and embryonic development of oocytes from preantral follicles[J]. *Bd Reprod*, 2001, 64 :375 - 381.
- [17] YAMANCHI N, NAGA T. Mitochondrial formation on in denuded porcine oocyte after in vitro maturation in the presence of cysteamine[J]. *Bol Reprod*, 1999, 61 :828 - 833.
- [18] YASHIDA M, ISHIZAKI Y, KAWAGISHI H, et al. Effects of pig follicular fluid on maturation of pig oocytes in vitro and on their subsequent fertilizing and developmental capacity in vitro[J]. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1992, 95(2) :481 - 488.
- [19] GEORGOS VAZIAS, DANIEL HAGEN. Effects of porcine follicular fluid and oviduct conditioned media on maturation and fertilization of porcine oocytes in vitro[J]. *Bd Reprod*, 1999, 28 :58 - 66.
- [20] 苏有强, 夏国良, 陈勇, 等. HK 对猪卵母细胞体外自发成熟抑制作用的研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2000, 31(1) :22 - 27.
- [21] HYTTTEL P, GREVE Y. Changes in cortical granules during porcine oocyte maturation[J]. *Canate Res*, 1999, 11(3) :330 - 332.
- [22] ABEYDEERA L R, WANG W H, CONILEY T C, et al. Presence of β -mercaptoethanol can increase the glutathione content of pig oocyte after in vitro fertilization: relevance to intracellular glutathione[J]. *Blo Reprod*, 1998, 58 :213 - 218.
- [23] HIDEKI TATEMOTO, KEISUKE OOTA, KOJI SHIGETA, et al. Enhancement of developmental competence after in vitro fertilization of porcine oocytes by treated with AA2G during in vitro maturation[J]. *Bol Reprod*, 2001, 65 :1 800 - 1 806.