

猪卵母细胞体外成熟的影响因素

王星 (辽东学院农学院动物科学系, 辽宁丹东 118003)

摘要 综述了猪卵母细胞体外成熟的影响因素, 并探讨了猪卵母细胞体外成熟的最佳条件和培养体系。

关键词 猪; 卵母细胞; 体外成熟; 影响因素

中图分类号 S828 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)14-04209-01

卵母细胞体外成熟 (IVM) 的研究可为胚胎发育生物学、体外受精及转基因动物、核移植等技术的研究提供理论依据。意大利科学家 Mattioli 最先进行猪卵母细胞的体外培养研究, 并且用体外成熟的卵母细胞进行体外受精, 获得了第 1 例试管猪。目前体外成熟培养环境还远未达到体内的生理水平, 猪卵母细胞体外成熟受多种因素影响。

1 卵母细胞的采集

1.1 卵泡大小及形态 几乎所有的试验都表明, 来自直径 3~6 mm 卵泡的卵母细胞形态最好, 培养效果最佳。从育龄盛期的健康成年母猪获得的卵母细胞形态完好, 体外成熟培养效果好。来自明亮卵泡的卵母细胞的成熟率明显高于来自浑浊卵泡的卵母细胞。

1.2 卵巢离体时间与温度 卵巢离体时间越短越好, 通常情况下卵巢离体时间应在 3 h 之内。体外成熟率、体外受精率、卵裂率有随离体时间的增长而降低的趋势^[1]。较适宜的卵巢送达温度范围是 32~35 ℃。一旦卵巢回收温度低于 25 ℃, 猪的卵母细胞将受到低温应激, 温度还将通过影响猪卵母细胞的体外成熟继而影响到体外受精及卵母细胞激活后胚胎的发育^[2]。

1.3 卵丘细胞 卵母细胞周围的卵丘细胞层数及其完整性是影响卵母细胞体外成熟的重要因素之一, 一般选择卵丘致密、胞质均匀的卵母细胞进行体外培养。卵母细胞所需的营养物质依赖卵丘细胞提供, 两者间还通过缝隙连接进行信号传导, 进而调节卵母细胞的生长和成熟。裸卵在抽取前的发育程度居于较为成熟的位置, 因而其卵丘细胞很容易脱落, 较高的极体率说明其发育较早, 但裸卵的成熟质量不是最好。A 类 (卵丘细胞 4 层以上) COCs 的成熟率显著高于 B 类 (2~3 层) 和 C 类 (局部 1~2 层), B 类的又显著高于 C 类^[3]。

但卵丘扩散是否良好对卵母细胞核成熟无明显的影响, 猪卵丘细胞的扩展不依赖于卵母细胞。培养 24 h 后去掉卵丘细胞并不影响卵母细胞的核成熟, 带有壁颗粒细胞的 COC 卵丘的扩散情况明显优于不带壁颗粒细胞的 COC, 其成熟率也显著高于后者^[4]。

1.4 采集方法 剖解法是用手术刀片对卵巢表面卵泡进行纵横方向切割, 在培养液中反复冲洗, 采集其中的卵母细胞的方法。该法能保持卵母细胞周围卵泡细胞的完整性, 回收率相对较高, 卵丘扩散率高, 缺点是容易造成污染; 抽吸法是用带有 18 号针头的注射器对卵巢表面卵泡进行抽取的方法。抽吸法回收速度快, 不易污染, 但容易损伤卵丘细胞, 影响成熟率^[5]。

2 体外培养条件

2.1 培养时间及培养液 猪卵母细胞体外成熟的培养时间通常需要 48 h 左右。体外培养 48~72 h 虽可获得较高的成熟率, 但大部分成熟卵母细胞已处于退化阶段。现在实验室多采用 42~44 h 作为猪卵母细胞体外成熟培养的适宜时间。

目前基础培养液以 TCM 199 和 NCSU 23 使用居多。虽然这 2 种培养基在卵母细胞成熟率上差异不显著, 但两者的卵裂率差异显著 (分别为 15.7% 和 36.0%)。现在猪卵母细胞体外培养条件大多采用 38~39 ℃, 5% CO₂, 饱和湿度, 也可根据不同的试验设计来调整某些指标。

2.2 pH 值 猪卵母细胞对碱性条件的耐受能力比对酸性条件的耐受能力强, 在培养液 pH 值低于 6.5 时几乎全部死亡, 而 pH 值达到 8.9 时死亡率仅为 31.7%^[6]。卵巢保存的时间对于卵泡液的 pH 值、卵母细胞减数分裂、核的 DNA 碎裂的出现都有影响。随着保存时间的延长, 卵泡液 pH 值呈下降趋势, 在 1~3 h 内细胞核 DNA 碎裂差异不明显, 6~12 h 明显碎裂, 差异呈上升趋势^[7]。

2.3 卵泡液 卵泡液是卵母细胞体内发育的介质, 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, 作为卵母细胞发育的微环境, 对其成熟具有重要的调节作用, 能提高卵母细胞质成熟的质量, 增加胚胎的发育能力。在体外, 猪卵泡液可促进猪卵母细胞胞质成熟, 从而显著提高卵母细胞受精后的原核形成率, 但这种作用不能被促性腺激素和类固醇激素所代替。

2.4 激素 促卵泡素 (FSH) 和促黄体素 (LH) 是参与卵泡发生的最主要的蛋白质激素, 它们与颗粒细胞、内膜细胞上的受体结合并激活环腺苷酸 (cAMP) 系统, 提高细胞中参与类固醇合成的一系列酶的活性, 导致类固醇激素尤其是雌二醇的合成及其在血液与卵泡液中浓度的增加, 从而促进卵泡卵母细胞的生长和发育。通过在培养液中添加 FSH 和 LH 可促进卵母细胞的成熟^[8], 用 PMSG 和 hCG 代替也取得类似结果。含有 FSH、PMSG 的成熟培养液可同时诱导猪卵母细胞的核成熟排出第一极体, 并和卵丘细胞的扩展有关^[9]。胰岛素在高浓度时可以结合 IGF-I 的受体, 也可以增加猪体外成熟卵母细胞的受精率和卵裂率^[10]。

2.5 血清 血清能够促进原始卵泡卵母细胞生长启动, 并提供生长所需的 1 种或几种因子, 培养液中添加动物血清可促进卵母细胞成熟, 应用最广泛的是牛血清^[11]。添加发情母牛血清或犊牛血清, 卵母细胞的成熟效果好于添加牛血清白蛋白。现在大多数实验室采用在培养液中添加 10% 的胎牛血清。近年来, 许多研究者又在培养液中添加一定比例

作者简介 王星 (1972-), 男, 辽宁丹东人, 讲师, 从事动物繁殖与生物技术的研究。

收稿日期 2007-02-01

(上接第 4209 页)

的猪血清,添加新生仔猪血清猪卵母细胞的成熟效果最好,成熟率最高,胎牛血清次之,去势公猪血清最差^[12]。

2.6 生长因子 发育卵泡中存在多种促生长因子及其受体,它们同时影响卵膜细胞和颗粒细胞的增殖和分化,并参与调节卵母细胞的成熟。颗粒细胞一旦开始增殖分化,就分泌大量的细胞因子,如表皮生长因子(EGF),碱性、酸性成纤维细胞生长因子(bFGF, aFGF),抑制素和活化素等,这些因子对卵母细胞的生长起决定作用^[13]。

2.7 巯基物质 含巯基的物质如半胱氨酸、谷胱甘肽、谷氨酰胺等对猪卵母细胞的胞质成熟有明显的促进作用。这些物质不但可以清除卵母细胞内的氧自由基,而且在细胞分裂时作为二硫键断裂的供氢体。卵母细胞成熟培养液中添加较多的是半胱氨酸。试验表明,在 M199 成熟培养液中添加半胱氨酸还可显著提高卵母细胞发育后期的卵裂率^[14]。

参考文献

- [1] 文国艺,黎宗强,陈自洪,等.影响猪卵母细胞体外成熟的一些物理性因素[J].广西农业科学,2003,36(6):60-61.
- [2] 邢凤英,吴中红,曾申明,等.猪卵母细胞体外成熟和孤雌激活效率影响因素分析[J].中国农业科学,2004,37(1):125-129.
- [3] 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):15-17.

- [4] 孙兴参,岳奎忠,马所峰,等.猪卵丘扩展与卵母细胞核成熟关系的研究[J].中国农业科学,2002,35(1):85-88.
- [5] 陈晓宇,刘东,李青旺,等.不同收集方法对猪卵母细胞体外成熟培养的影响[J].上海畜牧兽医通讯,2003(1):24-25.
- [6] 索永善,李跃民,华云芳,等.pH 值对猪卵母细胞体外成熟培养的影响[J].畜牧兽医杂志,2005,24(2):4-5.
- [7] PIMPRAPAR WONGSRIKEAO. Effects of ovary storage time and temperature on DNA fragmentation and development of porcine oocytes [J]. Journal of Reproduction and Development, 2005,51(1):51-87.
- [8] 李晟阳,罗光彬,张晓华,等.促卵泡素与促黄体素对猪卵母细胞体外成熟的影响[J].华北农学报,2006,21(1):63-67.
- [9] ZHANG M,TAO Y,ZHUO B.Atrial natriuretic peptide inhibits the actions of FSH and forskolin in meiotic maturation of pig oocytes via different signalling pathways[J].Journal of Molecular Endocrinology, 2005,34:459-472.
- [10] MYEONG SEOP LEE. The beneficial effects of insulin and metformin on in vitro developmental potential of porcine oocytes and embryos[J].Biology of Reproduction,2005,73:1264-1268.
- [11] 卢晟盛,张艳玲,石德顺,等.在成熟过程中添加牛血清和猪卵泡液对猪卵母细胞核成熟及体外受精后早期胚胎发育的影响[J].黑龙江畜牧兽医,2002(8):81-83.
- [12] 张莉,冯书堂.影响猪卵母细胞体外成熟的相关因素[J].中国农业科学,2006,39(9):1891-1896.
- [13] 刘珠果,尚书江,阎新龙,等.IGF-I、TGF- α 、bFGF 对猪卵母细胞体外成熟和卵裂的影响[J].中国农业科学,2005,38(10):2111-2116.
- [14] 叶华虎,魏泓,陈俊颖.猪卵母细胞在不同培养液中成熟后的发育潜力[J].第三军医大学学报,2003,25(6):511-513.