

不同处理方法对家兔超数排卵的影响

胡军和^{1,2}, 屈雷² (1. 榆林学院生命科学学院, 陕西榆林 719000; 2. 陕北白绒山羊工程技术研究中心, 陕西榆林 719000)

摘要 [目的] 确定家兔稳定高效的超数排卵方法。[方法] PMSG 试验组母兔颈部皮下注射 PMSG 40、60、80 IU 只, FSH 试验组母兔颈部皮下注射 FSH 6 次, 每次间隔 12 h, 注射量递减, 总用量分别为 80、60、40 IU 只, 注射 PMSG、FSH 后耳缘静脉注射 HCG 100 IU 只, 计算卵子回收率, 比较 2 种处理方法的超数排卵效果。[结果] 应用 PMSG 超排时, 60 IU 只试验组的卵子回收率显著高于其他 2 组 ($P < 0.05$)。应用 FSH 递减法超排时, 总用量为 60 IU 只的试验组的卵子回收率显著高于其他 2 组 ($P < 0.05$)。FSH 递减法试验组和 PMSG 试验组的卵子回收率无显著差异 ($P > 0.05$)。[结论] 以 60 IU 只的 PMSG 联合 100 IU 只的 HCG 对家兔进行处理的超排效果最好, 卵子回收率达 70%。

关键词 家兔; 超数排卵; PMSG; FSH

中图分类号 S829.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)25-10897-02

Effect of Different Treatment Methods on Superovulation of Rabbits

HU Jun-he et al (School of Life Science, Yulin College, Yulin, Shaanxi 719000)

Abstract [Objective] The purpose was to confirm the stable and high efficient superovulation method for rabbits. [Method] As for PMSG test group, the female rabbit was subcutaneous injected on its neck with PMSG 40, 60, 80 IU per rabbit, and for FSH test group, the female rabbit was FSH subcutaneous injected on its neck for 6 times at intervals of 12 h, the injection volume was in descending, and total dosage was 80, 60 and 40 IU per rabbit resp., after PMSG and FSH injection, the intravenous injection through the ear edge vein with HCG 100 IU per rabbit, the egg recovery rate was calculated, and the superovulation effect of two treatment methods was compared. [Result] When using PMSG superovulation, the egg recovery rate for 60 IU per rabbit test group was significantly higher than the other 2 groups ($P < 0.05$). As using FSH diminishing method for superovulation, the egg recovery rate for total dosage of 60 IU per rabbit in test group was obviously higher than the other 2 groups ($P < 0.05$). The egg recovery rate for FSH diminishing method test group and PMSG test one had no evident difference ($P > 0.05$). [Conclusion] The superovulation effect was the best with the treatment on rabbits in combination of 60 IU per rabbit in PMSG group with 100 IU per rabbit in HCG one and the egg recovery rate was up to 70%.

Key words Rabbits; Superovulation; PMSG; FSH

目前, 动物繁殖学科已进入一个胚胎工程时代。在家畜的品种改良中, 体外受精技术为胚胎生产提供了廉价而有效的手段, 对充分利用优良品种资源等有重要价值。随着对哺乳动物的胚胎发育机理的研究, 科技工作者对卵母细胞及早期胚胎的需求量越来越大。利用外源激素对发情的母兔进行超排处理, 是获得卵子和胚胎的有效手段。超数排卵(简称超排), 是以各种外源性促性腺激素诱发动物的许多卵泡发育并排出具有受精能力的卵子的过程, 它既能提高良种母畜的繁殖潜力, 又能为胚胎学、生殖生理学等提供一种研究手段^[1]。家兔的超排效果存在品种、年龄、季节及个体差异, 并受激素组合、剂量、效价、营养状况、发展阶段等多种因素的影响^[2-3]。其中超排所用药物, 剂量及组合是一个很重要的影响因素, 且超排时间控制也是家兔超排成功的因素之一。笔者利用不同 PMSG 剂量和不同剂量 FSH 递减法进行试验, 确定家兔稳定高效的超排方法, 为取得大量廉价卵母细胞和胚胎摸索有效途径。

1 材料与试验方法

1.1 试验动物 试验兔选用性成熟的健康且未妊娠的母兔 18 只, 随机分为 A、B 2 组, 每组 9 只, 体重为 2~3 kg/只, 年龄为 0.5~1 岁, 试验兔均为笼养, 每天饲喂 3 次(早、中、晚), 以青草和包菜为主, 自由饮水, 饲养地干燥、通风。进行试验前先饲养 1 周, 注意观察有何异常并及时记录。

1.2 试剂和用品 外源激素。PMSG(080318)、HCG(080229)、FSH(080419), 均购自宁波激素制品责任有限公司。

冲卵液(PBS + 10% NBS) PBS 缓冲液的配制。称取 NaCl 10.00 g, Na₂HPO₄·12H₂O 1.44 g, KCl 0.25 g, KH₂PO₄ 0.25 g, 用

四蒸水将试剂溶于 500 ml 烧杯中, 磁力搅拌器搅拌直至完全溶解后, 用 1 000 ml 容量瓶定容, 摇匀, 分装于 200 ml 的玻璃瓶中, 15 磅高压灭菌 30 min, 4℃ 冰箱保存。试验用品。试验动物保定架、手术刀、手术剪、止血钳、注射器、玻璃培养皿、离心管、注射器、检卵皿、吸尿管(自制)等。

1.3 试验设计

1.3.1 PMSG 处理。 试验分 3 个组(A₁、A₂、A₃), 各试验组母兔分别颈部皮下注射 PMSG 40、60、80 IU 只, 72 h 后耳缘静脉注射 HCG 100 IU 只, 先用酒精棉球消毒耳朵边缘, 接着用酒精棉球消毒过的圆滑玻璃棒涂上甘油刺激母兔的阴部(每次 3 min 左右), 诱发母兔排卵。在注射 HCG 14~16 h 后手术冲卵。同时记录左右卵巢(图 1)的排卵点、回收卵子数、充血卵泡数。连续冲洗 3 遍, 注意冲卵液不得流失。最后再将接有冲卵液的表面皿置于实体显微镜下, 检查冲出卵子的数量。



图1 排卵的卵巢

Fig.1 The ovulating ovary

1.3.2 FSH 处理。 对试验母兔(B₁、B₂、B₃) 颈部皮下注射 FSH 6 次, 每次间隔 12 h, 注射量递减(表 1), 其余操作步骤同上。

1.3.3 处理方法对比。 在上述试验的基础上, 分别选择卵子回收率好的剂量 PMSG 组、FSH 组进行对比试验, 比较 2 种不

基金项目 陕西省教育厅青年基金项目(07JK44)。

作者简介 胡军和(1979-), 男, 湖南双峰人, 讲师, 从事动物胚胎工程方面的研究。

收稿日期 2008-06-11

同处理方法的超排效果。

表1 试验母兔注射FSH的剂量

Table 1 The injection dose of FSH in test female rabbits IU 只

时间 Time	B ₁		B ₂		B ₃	
	am	pm	am	pm	am	pm
第1天 The first day	20.0	20.0	15.0	15.0	10.0	10.0
第2天 The second day	12.5	12.5	10.0	10.0	7.5	7.5
第3天 The third day	7.5	7.5	5.0	5.0	2.5	2.5

注: 在注射最后1次FSH间隔12h后注射HCG, 耳缘静脉注射100IU只。

Note: 100IU HCG was injected into each rabbit by ear vein after the last injection of FSH 12 h.

1.4 统计方法 用SPSS软件对所得数据进行统计学分析。

2 结果与分析

2.1 不同剂量PMSG对家兔超数排卵的影响 依试验设计1进行操作, A₂组卵子回收率显著高于A₁、A₃组(P < 0.05), 但A₁、A₃组卵子回收率无显著差别(P > 0.05)(表2)。

表2 不同剂量PMSG对白兔超数排卵的影响

Table 2 Effects of different dosage of PMSG on the superovulation in female rabbits

PMSG IU 只	排卵点 Ovulation point 个	充血卵泡数 Hyperaemia follicle number 个	卵子回收数 Recovered ovum number 个	卵子回收率 Ovum recovery rate %
40	39	6	21	53.85 a
60	78	12	60	76.92 b
80	45	27	27	60.00 a

注: 同列不同字母表示有显著性差异(P < 0.05)。下同。

Note: Different letters in the same column indicate significant difference at 0.05 level. The same as below.

2.2 不同剂量FSH递减法对家兔超数排卵的影响 依试验设计2进行操作, B₂组卵子回收率显著高于B₁、B₃组(P < 0.05), 但B₁、B₃组卵子回收率无显著差别(P > 0.05)(表3)。

表3 不同剂量FSH递减法对家兔超数排卵的影响

Table 3 Effects of the decreasing method of different doses of FSH on the superovulation of female rabbits

FSH IU 只	排卵点 Ovulation point 个	充血卵泡数 Hyperaemia follicle number 个	卵子回收数 Recovered ovum number 个	卵子回收率 Ovum recovery rate %
80	48	15	21	43.75 a
60	54	9	36	66.67 b
40	51	3	24	47.05 a

2.3 不同处理方法对家兔超数排卵的影响 依试验设计3进行操作, FSH组与PMSG组卵子回收率无显著差别(P > 0.05)(表4)。

3 讨论

(1) 哺乳动物出生时, 卵巢内有大量的原始卵泡, 大约有10万个以上, 但在雌性动物一生中仅约400~500个卵泡发育成熟, 经自然排卵所排出的卵母细胞是相当少的。体内激

素水平不足不能使同一批生长的卵泡都达到成熟阶段, 所以

表4 不同处理方法对家兔超数排卵的影响

Table 4 Effects of different treatment methods on the superovulation of female rabbit

处理 Treatment	排卵点 Ovulation point 个	充血卵泡数 Hyperaemia follicle number 个	卵子回收数 Recovered ovum number 个	卵子回收率 Ovum recovery rate %
60IU 只FSH	65	12	46	70.77 a
60IU 只PMSG	60	11	42	70.00 a

卵泡在发育的不同阶段闭锁, 即卵泡发育到一定程度后自行退化。由此看出卵泡间的生长发育并非完全独立, PMSG、FSH对雌性动物有促进卵泡发育、排卵和黄体形成的功能, HCG具有诱导排卵前的卵泡生长发育并触发排卵的作用。这是超数排卵的理论依据。研究结果表明, 60IU只PMSG处理的兔子, 卵巢的卵子回收率显著高于40IU只和80IU只处理组。这可能是由于超排处理时, 激素的剂量过低, 不足以引起较多的卵泡成熟; 剂量过高, 又引起“过刺激”而减少卵子的排出率。试验还发现, 随着PMSG剂量的增加, 卵巢上就出现较多的充血卵泡。Kennelly等研究表明, 由于过刺激, 一方面因内源雌激素分泌而影响卵子的运行速度, 另一方面有部分卵子残留泡中, 还有可能是由于激素水平过高而使卵子发育不正常, 产生了过大的卵子, 这样的卵子不能进入输卵管伞。剂量较小时, 不足以引起较多卵泡成熟^[4]。通过对3种不同剂量FSH递减法的超排效果比较可知, 60IU只的FSH的超排效果, 在卵子回收率上都显著优于40IU只和80IU只处理组。这可能也是由于过低的超排剂量不足以引起较多卵泡的成熟, 而过高剂量可引起“过刺激”使排卵量减少。

(2) 比较PMSG处理和FSH递减法2种不同激素的超排效果, 发现2种方法差异不显著, 这可能是由于PMSG具有FSH和LH的双重作用, 但以FSH的功能为主。因此, 适宜的PMSG剂量可以促进卵巢上大量卵泡的发育, 可以代替FSH用于超排处理。但是在使用PMSG过程中, 如果大剂量使用则会引起卵泡囊肿和卵泡充血, 而且对卵巢产生过刺激^[5]。虽然PMSG存在这些缺点, 但相比之下, FSH处理的成本高、处理步骤烦琐、耗费人力物力, 鉴于此, 生产中可以用PMSG法代替FSH递减法进行超排处理, 但剂量要适量。以60IU只的PMSG联合100IU只的HCG处理效果最好, 其卵子回收率可达70%以上。

参考文献

- [1] 张汝勇. 家畜胚胎移植技术及发展方向[J]. 辽宁畜牧兽医, 2001(4): 16-17.
- [2] 廉颖, 李劲松, 朱子玉, 等. 影响家兔超数排卵因素的研究[J]. 中国兽医科技, 2001, 31(4): 14-16.
- [3] 林峰, 陈玉霞, 高腾云, 等. 不同处理方法对波尔山羊胚胎移植效果的影响[J]. 中国农学通报, 2005, 21(7): 10-12.
- [4] KENNELLY J J, FOOTE R H. Superovulatory response of pre and post pubertal rabbits to commercially available gonadotropins[J]. J Reprod Fert, 1965, 9: 177-188.
- [5] 张贵学, 秦鹏春. 超排兔卵巢泡腔充血的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 1995(11): 1-2.