

运输温度与时间对猪孤雌胚胎发育的影响

张卫红², 闫军^{*}, 冯冲², 龙川¹, 张兆旺, 潘登科^{* **} (1. 甘肃农业大学动物科学技术学院, 甘肃兰州 730070; 2. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 畜禽遗传资源与利用农业部重点实验室, 北京 100193)

摘要 [目的] 比较不同运输温度与时间对猪孤雌胚胎发育的影响, 确立猪克隆胚胎的最佳运输温度与时间。[方法] 研究不同温度(37、38、39)对孤雌胚胎卵裂率、囊胚率的影响; 不同时间(2、3、4 h)对孤雌胚胎卵裂率、囊胚率的影响。[结果] 培养3 h后, 在39℃运输时, 孤雌胚胎的卵裂率和囊胚率与37、38℃的卵裂率和囊胚率相比, 差异显著($P < 0.05$); 培养3 h后, 孤雌胚胎的卵裂率和囊胚率与培养2 h、4 h的卵裂率和囊胚率相比, 差异显著($P < 0.05$)。[结论] 在39℃, 3 h内进行孤雌胚胎的运输, 能获得较高的卵裂率、囊胚率。

关键词 猪; 运输时间; 运输温度; 孤雌胚胎; 卵裂率; 囊胚率

中图分类号 S828 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)13-05998-02

Effects of Different Transport Temperature and Transport Time on Development of Porcine Parthenogenetic Embryo

ZHANG Wei-hong et al (College of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070)

Abstract [Objective] The research aimed to establish the best transport temperature and transport time of porcine parthenogenetic embryo clone. [Method] The effects of different temperatures (37, 38, 39) on parthenogenetic embryo cleavage and blastocyst rate and the effects of different time (2, 3, 4 h) on parthenogenetic embryo cleavage and blastocyst rate were studied. [Result] There were statistical differences at 0.05 level of the parthenogenetic cleavage rate and blastocyst rate between development of parthenogenetic embryos at 39, 37 and 38. And there were statistical differences at 0.05 level of the parthenogenetic cleavage rate and blastocyst rate between development of parthenogenetic embryos in 3, 2 and 4 h. [Conclusion] This study suggested that carrying out the transport of parthenogenetic embryos at 39, within 3 h could obtain a higher cleavage rate and blastocyst rate.

Key words Porcine; Transportation time; Transportation temperature; Parthenogenetic embryos; Cleavage rate; Blastocyst rate

目前, 体细胞核移植已经在10余种动物中获得成功^[1-15]。体细胞克隆猪技术成功较晚。2000年, 世界上首例克隆猪出生^[4], 之后又相继有多个基因修饰猪顺利出生^[16-19], 使克隆猪和转基因猪在人类器官移植领域、人类疾病模型动物以及家猪保种和育种等方面的应用成为可能。胚胎移植是成功获得克隆猪和转基因猪的重要步骤。但大多数养殖场都在郊区, 离实验室较远, 胚胎移植时就必须进行胚胎运输, 运输过程中任何条件的变化都会对胚胎发育产生不良影响。其中运输的温度与时间是至关重要的2个因素。

孤雌生殖(Parthenogenesis)是用化学或物理刺激代替精子的作用诱发卵母细胞激活、进行有丝分裂、形成胚胎的繁殖过程, 孤雌胚胎为体细胞克隆胚生产条件的探索提供了比较合适的模型。因此, 试验比较了不同运输时间与温度对孤雌胚胎发育的影响, 为提高胚胎移植效率提供参考。

1 材料与试验方法

1.1 试验材料 除特别说明以外, 所有化学试剂均购自Sigma公司; 卵母细胞体外成熟以及胚胎培养耗材分别为NUNC, Greiner (German)公司产品; 半导体控温箱, 胚胎麦管。

抽卵液为无钙的杜氏磷酸盐缓冲液(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, DPBS), 添加了浓度0.1%(质量体积比)聚乙烯醇(Polyvinylpyrrolidone, PVA)配成; 卵母细胞体外成熟液为无牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA)的北卡罗林纳州大学23培养液(North Carolina State University-23, NCSU-23)添加浓度10%(体积比)猪卵泡液(Porcine Follicular Fluid, pFF, 自制), 浓度10 ng/ml表皮生长因子(Epidermal Growth Factor, EGF), 浓度10 IU/ml人绒毛膜促性腺激素(Human

Chorionic Gonadotropin, hCG)和浓度10 IU/ml孕马血清促性腺激素(Pregnant Mare Serum Gonadotropin, PMSG); 融合/激活液由浓度0.28 mol/L甘露醇, 浓度0.1 mmol/L氯化钙, 浓度0.1 mmol/L硫酸镁, 浓度0.5 mmol/L N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethane sulphonic acid, HEPES)以及浓度0.01%PVA组成; 胚胎培养液为猪合子培养基(PZM)+0.3%BSA; 浓度0.1%透明质酸酶。

1.2 试验方法

1.2.1 猪卵母细胞体外成熟(in vitro Maturation, IVM) 从屠宰场取初情期前母猪卵巢, 放入30~35℃含青霉素和硫酸链霉素的生理盐水中, 2 h内运回实验室。用配有18G针头的20 ml注射器抽吸卵巢上直径3~6 mm的卵泡, 经PVA-DPBS洗涤3遍后挑选卵丘包裹3层以上, 致密且胞质均匀的卵丘细胞-卵母细胞复合体(COGs), 再用IVM培养液洗涤3遍。将洗涤好的COGs转入IVM培养液中培养。COGs在39℃, 5%CO₂, 湿度100%的CO₂培养箱中培养39~40 h后, 用浓度0.1%透明质酸酶脱去卵丘细胞, 挑选排出第一极体且卵黄膜完整、卵周隙明显的卵母细胞。

1.2.2 卵母细胞孤雌激活。取上述脱去卵丘的M²卵母细胞, 用激活液洗涤3遍。再将卵母细胞转移到已经铺满激活液, 电极宽度为0.5 mm的融合槽(BTX, USA)中, 用CF-150B(BLS)细胞融合仪施加2个1.2 kV/cm, 100 μs的直流脉冲(DC)诱导激活。洗涤后将卵母细胞转移到PZM+7.5 μg/ml CB(细胞松弛素B)的液滴内作用4 h, 然后转移到培养液PZM中, 48和168 h观察并统计胚胎发育的卵裂率和囊胚率。

1.2.3 不同运输温度对孤雌胚胎发育的影响试验。卵母细胞进行孤雌激活后, 放入39℃, 5%CO₂, 湿度100%的CO₂培养箱中培养48 h后, 将5~6个孤雌胚胎吸入无菌胚胎麦管, 上下各留有气段, 保证胚胎对气体的需要, 用无菌铝箔纸将胚胎麦管包裹, 置于半导体控温箱内, 模拟运输过程。在5%CO₂的条件下, 分别于37、38和39℃培育3 h后, 将其继续放入39℃, 5%CO₂, 湿度100%的CO₂培养箱中培养, 在48和

基金项目 国家“863”项目(2006AA02Z113); 国家基本科研业务费(yw-ftd-1); 中国农业科学院院长基金资助。

作者简介 张卫红(1981-), 男, 山西运城人, 在读硕士, 从事猪胚胎生物技术研究。* 同等贡献。** 通讯作者, 博士, 副研究员, E-Mail: pandengke@yahoo.com.cn。

收稿日期 2009-02-15

168 h 观察并统计各组的卵裂率、囊胚率。

1.2.4 不同运输时间对孤雌胚胎发育的影响试验。将激活的卵母细胞放入39 °C, 5% CO₂, 湿度100%的CO₂培养箱中培养48 h后,放入半导体控温箱内,在最佳温度下分别培养2、3和4 h后,将孤雌胚胎放入39 °C, 5% CO₂, 湿度100%的CO₂培养箱中培养,在48和168 h观察并统计各组的卵裂率、囊胚率。

1.3 统计与分析 每组数据测定至少重复3次以上,数据以统计软件SAS的GLM过程进行分析,Duncan's检验方法判定处理间的差异显著性,当P<0.05时为差异显著。

2 结果与分析

2.1 不同运输温度对孤雌胚胎发育的影响 在不同温度下培养3 h后,孤雌胚胎的卵裂率与囊胚率测定结果见表1。

由表1可知,39 °C时,孤雌胚胎的卵裂率为(90.0±4.3)% ,囊胚率为(33.8±7.4)% ,37、38 °C下的卵裂率为(72.6±6.9)%、(80.6±5.5)% ,囊胚率为(18.9±1.5)%、(26.0±2.2)% ,不同温度下的卵裂率和囊胚率间差异显著(P<0.05)。综合看来,39 °C是孤雌胚胎运输的最佳温度。

2.2 不同运输时间对孤雌胚胎发育的影响 孤雌胚胎在39 °C的半导体控温箱内培养不同时间后,卵裂率与囊胚率测定结果见表2。由表2可见,培养3 h后的孤雌胚胎卵裂率为(81.6±6.1)% ,囊胚率为(31.2±3.6)% ;培养2、4 h后的卵裂率为(64.9±9.6)%、(49.2±2.4)% ,囊胚率为(18.2±6.7)%、(19.7±2.9)% ,不同培养时间下的卵裂率和囊胚率间差异显著(P<0.05)。

表1 不同运输温度对孤雌胚胎发育的影响

Table 1 Effect of different transport temperature on the development of parthenogenic embryo

运输温度	培养卵数 个	卵裂数	卵裂率 %	囊胚数	囊胚率 %
Transport temperature	Number of oocytes cultured	Number of embryos cleaved	Rate of cleaved embryos	Number of blastocyst	Rate of blastocyst
37	207	147	72.6 ±6.9 c	34	18.9 ±1.5 c
38	261	204	80.6 ±5.5 b	50	26.0 ±2.2 b
39	264	224	90.0 ±4.3 a	86	33.8 ±7.4 a

注:不同小写字母表示在0.05水平有差异。下同。

Note: Different small letters mean significant difference at 0.05 level. The same as below.

表2 不同运输时间对孤雌胚胎发育的影响

Table 2 Effect of different transport time on the development of parthenogenic embryo

运输时间 h	培养卵数	卵裂数	卵裂率 %	囊胚数	囊胚率 %
Transport time	Number of oocytes cultured	Number of cleaved embryos	Rate of embryos cleaved	Number of blastocyst	Rate of blastocyst
2	213	127	64.9 ±9.6 b	39	18.2 ±6.7 b
3	217	170	81.6 ±6.1 a	64	31.2 ±3.6 a
4	200	80	49.2 ±2.4 c	30	19.7 ±2.9 b

3 结论与讨论

目前,关于胚胎运输的温度与时间对体外生产的胚胎发育的影响研究比较少。但关于采集猪卵巢所用生理盐水温度的报道很多,采用温度的高低也不同。大多数实验室的研究认为:当采用和体外培养相同或更高的温度保存卵巢时,可能使卵子受到热应激而影响其成熟后的质量^[20]。因此,在研究中采用了37、38和39 °C 3个温度保存胚胎。

试验结果表明,在39 °C时,孤雌胚胎的卵裂率和囊胚率与37、38 °C时相比较,差异显著(P<0.05)。39 °C时在半导体控温箱内培养3 h后,与培养2、4 h相比,孤雌胚胎的卵裂率和囊胚率差异显著(P<0.05)。因此,39 °C、3 h是进行体外生产胚胎的最佳运输温度和时间。

笔者将体外培养2 d的体细胞克隆猪胚胎以39 °C的半导体控温箱,3 h内运到猪场进行胚胎移植,获得了21头体细胞克隆猪,存活15头,其中13头为转-3脂肪酸去饱和酶基因 sFat-1 克隆猪,体细胞克隆猪的克隆效率(产仔数/移植胚胎)为1.1%^[21]。

参考文献

- [1] WILMUT I, SCHNEKE A E, MCWHIR J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells[J]. Nature, 1997, 385: 810-813.
- [2] KATO Y, TAN T, SOTOMARU Y, et al. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult[J]. Science, 1998, 282: 2095-2098.
- [3] BAGUIS A, BEHBOODI E, MELICANDI T, et al. Production of goats by somatic cell nuclear transfer[J]. Nat Biotechnol, 1999, 17: 456-461.
- [4] POLEJAEVA I A, CHENS H, VAUGHN T D, et al. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells[J]. Nature, 2000, 407: 86-90.
- [5] ONSH A, IWAMOTO M, AKITA T, et al. Hg cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei[J]. Science, 2000, 289: 1188-1190.
- [6] SHINT, KRAEMER D, PRYOR J, et al. A cat cloned by nuclear transplantation[J]. Nature, 2002, 415: 859.
- [7] CHESNE P, ADENOT P G, VIGIETTA C, et al. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells[J]. Nat Biotechnol, 2002, 20: 366-369.
- [8] WOODS G L, WHITE K L, VANDERWALL D K, et al. A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer[J]. Science, 2003, 301: 1063.
- [9] CESARE G, IRINA L, GABRIELLA C, et al. A cloned horse born to its dam twin[J]. Nature, 2003, 424: 635.
- [10] ZHOU Q, RENARD J P, FRIEC G L, et al. Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation[J]. Science, 2003, 302: 1179.
- [11] LI Z, SUN X, CHEN J, et al. Cloned ferrets produced by somatic cell nuclear transfer[J]. Dev Biol, 2006, 293: 439-448.
- [12] LEE B C, KIM M K, JANG G, et al. Dogs cloned from adult somatic cells[J]. Nature, 2005, 436: 641.
- [13] GIBELI J B, STICE S L, GOLLEKE P J, et al. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts[J]. Science, 1998, 280: 1256-1258.
- [14] MCCREATH K J, HOWCROFT J, CAMPBELL K H, et al. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells[J]. Nature, 2000, 405: 1066-1069.
- [15] LAI L, KOLBER S D, PARJ K W, et al. Production of alpha 1,3 galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning[J]. Science, 2002, 295: 1089-1092.
- [16] DAI Y, VAUGHN T D, BOONE J, et al. Targeted disruption of the alpha 1,3 galactosyltransferase gene in cloned pigs[J]. Nat Biotechnol, 2002, 20: 251-255.
- [17] HAO Y H, YONG H Y, MURPHY C N, et al. Production of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) over-expressing piglets[J]. Transgenic Research, 2006, 15: 739-750.

IFN- γ 含量明显升高;与模型对照组相比,HPE 组肺中IFN- γ 含量均有不同程度的升高,差异达极显著水平($P < 0.01$);病毒唑组 IFN- γ 含量显著升高($P < 0.05$)。

表1 HPE 对流感病毒感染小鼠肺中TNF- α 含量的影响

Table 1 The influences of HPE on TNF- α content in the lung of mice infected with IAV

组别 Group	药物剂量 Dose of drug ng/kg	TNF pg/ml
正常对照组 Normal control group	-	39.720 \pm 0.593 **
模型对照组 Model control group	-	43.910 \pm 0.782
病毒唑组 Ribavirin group	10	41.970 \pm 0.061 *
HPE 高剂量组 HPE higher dose group	100	41.780 \pm 0.089 *
HPE 低剂量组 HPE lower dose group	50	41.550 \pm 0.653 *

注:小鼠数n=9;*表示与模型对照组相比差异显著($P < 0.05$),**

表示与模型对照组相比差异极显著($P < 0.01$)。下同。

Note:The number of mice is 9. * indicated significant difference with model control group ($P < 0.05$), and ** indicated extremely significant difference with model control group ($P < 0.01$). The same as below.

表2 HPE 对流感病毒感染小鼠肺中IFN- γ 含量的影响

Table 2 The influences of HPE on IFN- γ content in the lung of mice infected with IAV

组别 Group	药物剂量 Dose of drug ng/kg	IFN pg/ml
正常对照组 Normal control group	-	40.530 \pm 0.382
模型对照组 Model control group	-	54.610 \pm 0.095
病毒唑组 Ribavirin group	10	51.310 \pm 0.636 *
HPE 高剂量组 HPE higher dosage group	100	66.760 \pm 0.157 **
HPE 低剂量组 HPE lower dose group	50	62.970 \pm 0.584 **

3 结论与讨论

(1) 下呼吸道病毒感染后的免疫炎症反应,是病毒侵袭机体后,作用于气道上皮细胞和炎症细胞所引起的炎症反应,其机制十分复杂,涉及多种炎症细胞及炎症因子,包括促炎因子、粘附分子、趋化分子、炎症抑制因子等多种细胞因子。按功能又可分为炎症促进因子和炎症抑制因子。肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 是重要的炎症促进因子,在体内产生

TNF- α 的主要细胞是单核巨噬细胞。TNF- α 对肺脏具有强烈的毒性,它能诱导肺内皮细胞活化、白细胞迁移、粒细胞脱颗粒和毛细血管渗漏等,从而诱发并进一步加重炎症反应。该研究结果表明,贯叶连翘提取物能降低流感病毒感染小鼠肺组织中TNF- α 含量,也就是说该提取物减轻了病毒所导致的肺组织的炎症反应,同时也验证了 Avato P^[4] 所证实的结论。IFN- γ 主要由活化的Th1 细胞和NK 细胞产生,是机体抗病毒感染中最重要的细胞因子之一。它不仅阻止病毒在体内复制和扩散,而且能对许多免疫细胞发挥强大的免疫调节作用,故IFN- γ 的激活在病毒性疾病的康复中具有重要的地位。该研究结果表明,贯叶连翘提取物能提高流感病毒感染小鼠肺组织中IFN- γ 含量,这说明该提取物可能阻止了流感病毒在小鼠体内的复制和扩散,从而起到了清除流感病毒,减轻肺损伤的作用。

(2) 该研究表明,贯叶连翘提取物对流感病毒所致小鼠免疫功能的调节,可能是通过调控TNF- α 和IFN- γ 的变化来调节其作用的。本课题组同时进行的研究表明,贯叶连翘提取物可有效降低小鼠肺指数,降低肺组织悬液病毒血凝效价并延长小鼠平均存活天数,降低小鼠感染病毒所引起的死亡率,且呈一定的量-效关系(待发表),但其临床治疗流感病毒感染的实际疗效还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 杨波,伍参荣.七味白术散对人轮状病毒感染乳鼠血清IFN- γ ,TNF- α 的影响[J].中国中医药信息杂志,2005,12(3):36.
- [2] HUDSON J B,BAZZOCCHI L,TOWERS G H N. Antiviral activity of hypericin [J]. Antiviral Res,1991,15:101.
- [3] MERYELO D,LAME G. The therapeutic agents dramatic antiretroviral activity and life toxicity at effective doses: Aromatic polycyclic dyes hypericin and pseudo-hypericin [J]. Proc Natl Acad Sci, USA,1988,85:5230-5234.
- [4] AVATO P,RAFFO F,GUGIEMI G,et al. Extracts from St. John's wort and their antimicrobial activity [J]. Phytotherapy Research,2004,18(3):230-232.
- [5] EVSILFEEVA V A,SIHRYAK S V. Immunotropic properties of biologically active products obtained from St. John's wort Hypericum perforatum [J]. Eksp Klin Farmakol,1996,59(1):51-54.
- [6] MLDNER VON H,ZOLLER M. Antidepressive Wirkung eines auf den Wirkstoffkomplex hypericin standardisierten Hypericumextraktes [J]. Arzneim Forsch/Drug Res,1984,34(8):918-920.
- [7] MLEINCK A J,DEBRUYNE T,APERS S,et al. Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection [J]. Planta Med,1998,64(2):97.
- [8] MLEINCK A J,DEBRUYNE T,APERS S,et al. Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection [J]. Proc Natl Acad Sci USA,2004,101:7335-7340.
- [9] HUHTER R H F,GRONDAHL C,SCHMIDT M,et al. Graafian follicles are older than ovarian stroma [J]. Journal of Reproduction and Fertility,1995,16:8-9.
- [10] 潘登科,张莉,周艳荣,等.体细胞核移植生产转-3 脂肪酸去饱和酶 sFat-1 克隆猪 [J]. 中国科学C 辑,2009,39(3):295-302.

(上接第5999页)

- [18] PHELPS C J,KOIKE C,VAUGHN T D,et al. Production of 1,3-galactosyltransferase deficient pigs [J]. Science,2003,299:411-414.
- [19] DONNA K S,JIANGXUE L,STEVEN R W,et al. 1,3-galactosyltransferase null pigs via nuclear transfer with fibroblasts bearing loss of heterozygosity mutations [J]. Proc Natl Acad Sci USA,2004,101:7335-7340.