

羔羊卵泡诱导发育、活体采卵和体外发育潜能研究

胡鹏飞^{1,2}, 张贵学^{1*}, 于国庆², 吴增华², 李向臣³, 关伟军^{3*}

(1. 东北农业大学动物科学技术学院, 哈尔滨 150030; 2. 辽宁省农业科学院风沙地改良利用研究所, 阜新 123000; 3. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193)

摘要: 本研究旨在探讨聚乙烯吡咯烷酮(Polyvinyl pyrrolidone, PVP)作为缓释剂在羔羊卵泡诱导发育中的应用效果, 以及品种、年龄、激素剂量和超排次数对活体采集卵母细胞数量和体外发育能力的影响。选用 4~12 周龄无角道塞特、萨福克母羔 120 只, 分为 15%PVP 一次肌注组、30%PVP 一次肌注组和常规递减注射组, 每组 40 只, 注射剂量均为 120 IU, 对 30%PVP 一次肌注组按品种、周龄、激素剂量和重复次数分为 3~4 小组, 分别进行卵泡诱导发育和活体采卵, 并与屠宰场采集的卵母细胞对比进行体外受精和胚胎移植。结果表明, 采用 30% PVP 缓释 FSH 进行羔羊超排, 可以起到与常规超排一致的效果, 二者差异不显著($P>0.05$), 但采用 15% PVP 缓释 FSH 进行羔羊超排没有取得理想的效果, 在各项指标上均显著低于 30% PVP 组和常规递减注射组($P<0.05$); 采用 30% PVP 缓释 FSH 分别超排道塞特和萨福克羔羊, 只均获卵数和可用卵数差异不显著($P>0.05$), 4、6 和 8 周龄羔羊只均获卵数和可用卵数显著高于 12 周龄羔羊组($P<0.05$), 40 IU 组只均获卵数显著低于 80、120 和 240 IU 剂量组($P<0.05$), 240 IU 剂量组只均获卵数最高, 但与 120 IU 剂量组相比差异不显著($P>0.05$), 重复超排后只均获卵数和可用卵数显著低于初次超排($P<0.05$), 同时超排成功率也显著下降($P<0.05$); 与屠宰场采集的卵母细胞相比, 活体采集的羔羊卵母细胞体外成熟率、卵裂率、桑椹胚率和囊胚率均较低($P<0.05$), 但受精率二者差异不显著($P>0.05$); 分别冷冻保存了 95 和 140 个羔羊体外受精胚胎与屠宰场体外受精胚胎, 复苏后存活率分别为 95.8% 和 94.3%, 随后进行了胚胎移植, 移植后的妊娠率二者差异不显著($P>0.05$), 分别产羔 2 和 7 只。结果提示, 采用 30%PVP 缓释技术进行羔羊卵泡诱导发育, 可以取代常规的递减注射法; 年龄、激素剂量和超排次数影响活体采集的卵母细胞数量, 4 周龄的道塞特羔羊采用 30%PVP 缓释 120 IU FSH 可得到最高的只均获卵数和可用卵数, 活体采集的羔羊卵母细胞可经体外受精和胚胎移植获得后代, 具有与屠宰场采集的成羊卵母细胞相同的体外发育能力。

关键词: 聚乙烯吡咯烷酮; 羔羊; 超数排卵; 活体采卵; 体外受精; 胚胎移植

中图分类号: S814.1

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2011)02-0182-08

Study on Induction, *in vivo* Pick-up and *in vitro* Development of Prepubertal Lambs Oocytes

HU Peng-fei^{1,2}, ZHANG Gui-xue^{1*}, YU Guo-qing², WU Zeng-hua², LI Xiang-chen³, GUAN Wei-jun^{3*}

(1. College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 2. Institute of Windy Sands Improvement Technology, Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Fuxin 123000, China; 3. Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: This experiment was conducted to study the effect of Polyvinyl pyrrolidone (PVP) on

收稿日期: 2010-01-13

基金项目: 国家科技支撑项目(2006BAD13B08; 2008BADB2B01); 转基因生物新品种培育科技重大专项(2008ZX08009-003); 863 项目(2006AA10Z198; 2007AA10Z170)

作者简介: 胡鹏飞(1980-), 男, 黑龙江伊春人, 助理研究员, 博士, 主要从事动物遗传育种与繁殖的研究, Tel: 010-62819590, E-mail: pfhoo@hotmail.com

* 通讯作者: 张贵学, E-mail: gxzhang@neau.edu.cn; 关伟军, E-mail: weijunguan301@gmail.com

superovulation of prepubertal lambs, and the effects of factors such as breed, age, hormone dose and frequency of ovum pick-up on number of oocytes obtained were also studied. One hundred and twenty 4-12 week-old Poll Dorset and Suffolk lambs were assigned to three FSH treatments with forty lambs in each group. 120 IU FSH was diluted by PVP with percentage 0, 15% and 30%, respectively. Meanwhile, 30% PVP treatment was sub-grouped based on breed, age, hormone dose and frequency of ovum pick-up, superovulation and ovum pick-up were taken in each group. In addition, *in vitro* fertilization and embryo transplantation of lamb oocytes were conducted compared with oocytes from slaughter house. The results showed that: 1) There were no significant differences between 30% PVP group and routine method ($P>0.05$), whereas 15% PVP group was lowest in each index ($P<0.05$); 2) There were no significant differences between Poll Dorset and Suffolk lamb in number of follicles picked per lamb and available oocytes gained per lamb ($P>0.05$), number of oocytes picked-up from 4, 6 and 8 week-old lambs were higher than that of 12 week-old lambs ($P<0.05$), when 40 IU FSH was injected, number of oocytes picked-up was lowest ($P<0.05$), there were no significant differences between 120 and 240 IU groups ($P>0.05$), efficiency of superovulation decreased significantly in second time ovum pick-up ($P<0.05$); 3) *In vitro* maturation rate, cleavage rate, morula rate and blastula rate of oocytes from lambs were lower than that of oocytes from slaughter house ($P<0.05$), but there was no difference in fertilization rate ($P>0.05$); 4) 95 and 140 blastulas from lambs and slaughter house were cryopreserved, survival rate after thawed were 95.8% and 94.3%, respectively, there were no significant differences in pregnancy rate after transplantation ($P>0.05$), 2 and 7 lambs were born, respectively. These results indicated that routine superovulation could be substituted by Polyvinyl pyrrolidone mediated superovulation in lambs. Number of oocytes picked-up and *in vitro* developmental capacity were affected by age, hormone dose and frequency of ovum pick-up, max number of available oocytes were gained when 4 week-old Poll Dorset lambs were superovulated by 120 IU FSH diluted by 30% PVP, offspring could be produced by ovum pick-up from prepubertal lambs, indicating that ovum pick-up oocytes have the same developmental capacity as oocytes from slaughter house.

Key words: Polyvinyl pyrrolidone; lamb; superovulation; ovum pick-up; *in vitro* fertilization; embryo transplantation

幼畜超数排卵的研究始于 20 世纪 50 年代^[1-2]。

在羊方面,幼羔期垂体尚不能分泌足够量的促性腺激素刺激卵巢活动,卵巢对外源生殖激素敏感^[3],而且幼羔卵泡发育缺乏卵泡征集和优势化的能力,幼羔卵巢上同时有很多卵泡发育时也不会发生卵泡闭锁^[4-5],因此对幼羔进行超数排卵是一项高效率生产卵母细胞的新途径。将超排得到的卵子进行体外受精,可以扩大体外受精所需卵子的来源;将幼羔超排技术应用于绵、山羊育种,反复从遗传背景清楚的母羔体内采集卵母细胞生产胚胎,可显著提高优良母羊繁殖效率,缩短育种过程的世代间隔,加快良种培育进程;同时幼羔超排技术也为卵母细胞成熟、受精和胚胎的早期发育研究提供平台,应用前景十分广

阔。

目前对羔羊超排一般参考成羊超数排卵方法,用促卵泡素(FSH)分次连续注射数天,处理后卵巢机能恢复较快,排卵数较高,但 FSH 半衰期短,不但注射次数较多,而且增加了供体羔羊应激和操作繁琐性,在注射剂量和时间上易引起误差。在我国,聚乙烯吡咯烷酮(Polyvinyl pyrrolidone,简称 PVP)在兽药领域中正得到越来越广泛的重视和应用,PVP 是 N-乙烯基-2-吡咯烷酮线性聚合而成的水溶性白色粉末状高分子化合物,PVP 分子中的 N-H 或 O-H 键能与许多药物形成分子间的缔合作用,通过此作用延长药物释放时间和作用强度,延长药物在体内的释放和吸收时间,从而起到延效和缓释的作用。

为此,本试验采用PVP缓释技术,选用4~12周龄羔羊为实验材料,研究影响羔羊超排效果的因素,并与屠宰场采集的卵母细胞对比分析获得的卵母细胞体外发育能力,为生产上更有效地利用外源激素诱导卵泡发育进行活体采卵提供参考,同时为幼羔超早期利用技术应用于绵、山羊育种和肉羊集约化生产提供参考数据。

1 材料与方法

1.1 试验羊的选择与分组设计

选择辽宁省阜新市阜瑶牧业有限责任公司集约化羊场2009年2~3月份出生的发育整齐、健康的4~12周龄无角道塞特和萨福克母羔120只,分为15% PVP一次肌注组、30% PVP一次肌注组和常规递减注射组,每组40只,注射剂量均为120 IU;30% PVP一次肌注组内按品种、周龄、注射剂量和重复次数分为3~4小组,组间体质量差异不显著($P>0.05$)。

1.2 试剂及配制

注射用FSH购自宁波市三生药业有限公司;鹿眠宝购自青岛汉河动植物药业;头孢噻呋钠购自四川乾兴动物药业有限公司;PVP-40(Sigma,分子量40 000),M199,HEPES,HEPES-Na,NaHCO₃,肝素钠,青霉素,链霉素,FSH,LH,非必需氨基酸和必需氨基酸均购自Sigma;BSA购自Roche;谷氨酰胺,FBS购自Gibco。

采卵液:M199 + 10 mmol·L⁻¹ HEPES + 10 mmol·L⁻¹ HEPES-Na + 5 mmol·L⁻¹ NaHCO₃ + 10 mg·L⁻¹ 肝素钠 + 0.4% BSA + 65 mg·L⁻¹ 青霉素 + 50 mg·L⁻¹ 链霉素 + 100 mg·L⁻¹ 谷氨酰胺。

成熟培养液:M199 + 10% FBS + 10 μg·mL⁻¹ FSH + 10 μg·mL⁻¹ LH。

受精液:SOF + 20% 发情羊血清 + 20 mg·L⁻¹ 肝素钠。

胚胎发育液:SOF + 1% 非必需氨基酸(NEAA) + 1% 必需氨基酸(EAA) + 8 mg·mL⁻¹ BSA。

1.3 羔羊超排方法

PVP介导的一次肌注法:采卵前试验羊于18:00分别一次肌注用4 mL一定浓度PVP溶解FSH 40、80、120、240 IU,在第5天上午09:00~11:00采卵。

常规处理组:采卵前试验羊采用减量注射法分3 d,6次,间隔12 h注射FSH,3 d注射量比例为3

:2:1,注射总剂量分为40、80、120和240 IU 4组。注射最后一次FSH后12~14 h内采卵。

重复采卵:采卵后间隔3周按照原方法进行激素处理。

1.4 采卵方法

采用手术法采集羔羊卵巢卵母细胞,经超排处理的羔羊空腹24 h后,静脉注射鹿眠宝麻醉,于腹中线两侧近乳房处钝性开口2.5 cm,用子宫钳牵拉一侧子宫角将卵巢、子宫引出切口外,记录两侧卵巢卵泡数,用5 mL一次性注射器抽吸直径2~5 mm卵泡中的卵母细胞。将每只羊每侧卵巢的吸出液单独收集在灭菌培养皿中,37℃静置后,在实体显微镜下统计收集卵母细胞数,形态、颜色正常,并有2层以上卵丘细胞紧密包围的卵丘细胞-卵母细胞复合体视为可用卵母细胞。采卵结束后,用37℃林肯霉素冲洗卵巢并滴适量石蜡油防止粘连。按常规进行切口缝合并颈部注射头孢噻呋钠防止术后感染,常规饲养管理并观察恢复情况。

1.5 屠宰场卵母细胞的采集

预先制备100 μL成熟培养滴,上附石蜡油,放入培养箱预平衡2 h以上。母羊宰杀后立即扒皮开膛,取下卵巢,放入30℃无菌生理盐水中2 h运回实验室。卵巢用37℃含青霉素50 U·mL⁻¹、链霉素50 μg·mL⁻¹的无菌生理盐水冲洗2遍,用温水浴保存在无菌室,用灭菌滤纸吸干卵巢表面水分,放入60 mm平皿内,用5 mL一次性注射器吸取少量37℃采卵液后穿刺2~5 mm卵泡,将卵母细胞抽吸出来,将液体置于35 mm平皿内38℃静置,用1组间隔1.5 mm的4个双面刀片纵横划破抽吸后的卵巢表面,用采卵液反复冲洗,移出卵巢,38℃静置,每4组卵巢为1组,在体式显微镜下捡卵,进行质量上的筛选。

1.6 羔羊与屠宰场卵母细胞体外成熟及体外受精

超排获得的A、B级卵母细胞,分为道塞特和萨福克2组。

羔羊卵母细胞体外成熟培养:将可用卵母细胞在成熟培养液中洗3次,放入预平衡的100 μL成熟培养滴,20个·滴⁻¹,38.5℃,5% CO₂,培养24 h。

精子获能:采用上浮离心洗涤法制备精子,37℃水浴解冻一管冻精,小心加到盛有4 mL SOF的15 mL离心管底部,在37℃水浴锅中倾斜放置30 min,使精子上浮,从上层吸出3.5 mL液体于另一离心管中,1 000 r·min⁻¹离心5 min,弃上清,加入

受精液 1 mL,使精子密度为 $5 \times 10^6 \sim 6 \times 10^6$ 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 。

体外受精:体外成熟的卵母细胞用口吸管吹打,除去部分颗粒细胞,在受精液中洗 3 次,移入 30 μL 受精滴中,每滴放 10~20 枚,加入获能精子 20 μL ,使精子最终密度为 1×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$,共孵育 24 h 后观察受精率。

1.7 胚胎培养和冷冻保存

体外受精 24 h 后,受精卵用口吸管吹打脱除颗粒细胞,在胚胎发育液中洗 3 次,移入 30 μL 发育滴中,每滴放 15~20 枚受精卵培养。每 48 h 半量换液一次,受精后第 5 天统计 16 细胞以上胚胎数量。

胚胎冷冻:将四孔培养板置于恒温台上,分别放置母液(含 20% FBS, 0.025 $\text{mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ HEPES 和 0.005 96 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 肝素的 M199), VS1(含 10% DM-SO 和 10% EG 的母液), VS2(含 20% DMSO、20% EG 和 0.3 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖的母液)各 0.8 mL。将欲冷冻的胚胎先放在母液中,取 2~4 枚胚胎放入 VS1 中 1~3 min 后尽量少带 VS1 放入 VS2 中,连同 1~2 mL 的 VS2 放入空白孔中,用毛细玻璃管将胚胎吸入,立即投入液氮中(从放入 VS2 到投入液氮在 25 s 内完成)。

胚胎解冻:将四孔培养板置于恒温台上,分别放置 VS1、解冻液 1(含 0.3 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖和 20% FCS 的 M199)、解冻液 2(含 0.15 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖和 20% FCS 的 M199)和保持液(含 20% FCS 的 M199)各 0.8 mL。将毛细管从液氮中取出,在空气中停留 3~4 s,含液体的一端插入 VS1,在显微镜下观察到细管后用手指堵住细管另一端,让胚胎流入四孔板,确认数目后立即移入解冻液 1 中停留 1 min,移入解冻液 2

中停留 5 min,再移入保持液中停留 5 min,进行形态学评定,以透明带完整、胞质均匀为正常。

1.8 胚胎移植

采用手术法进行胚胎移植。受体羊空腹 24 h 后,静脉注射鹿眠宝麻醉,取 45° 斜倒立仰卧体位保定法,于腹中线两侧近乳房处钝性开口 2.5 cm,借助子宫钳翻动并拨开卵巢系膜,暴露卵巢,观察并记录两侧卵巢上的黄体、卵泡大小和数量。将判定合格的有黄体侧子宫角前端用子宫钳引出腹腔切口外,用钝针避开血管在子宫角前端扎孔,再用装好胚胎的移植针对准针孔插入子宫角腔内,将胚胎注入子宫角内,移植后将子宫角恢复原位。手术切口采用一针结节缝合,缝合后用碘酊消毒切口,颈部注射头孢噻唑钠防止感染。术后当天给水及草料,第 2 天放回大群。术后 8 d 开始早、晚定时试情。对于受体母羊两个情期以上不再发情者,按照妊娠母羊饲养管理。

1.9 数据分析

数据采用 SPSS 统计软件中的卡方检验和方差分析中的多重比较进行分析。

2 结果

2.1 PVP 介导的羔羊超排与常规超排效果比较

采用 30% PVP 缓释 120 IU FSH 进行羔羊超排,可以起到与常规超排一致的效果(表 1),二者差异不显著($P > 0.05$),但本试验采用 15% PVP 缓释 120 IU FSH 进行羔羊超排没有取得理想的效果,在各项指标上均低于 30% PVP 组和常规递减注射组($P < 0.05$)。

表 1 PVP 介导的羔羊超排与常规超排效果比较

Table 1 Comparison of efficiency of PVP-mediated superovulation and routine method

方法 Method	羔羊数 No. of lambs	超排反应率/% Rate of lambs response to superovulation	平均卵泡数 No. of follicles per lamb	只均获卵数 No. of follicles picked per lamb	回收率/% Recovery rate	平均可用卵/枚 Available oocytes per lamb
15% PVP	40	65.0 ^A (26/40)	35.65 ± 7.90 ^A	29.70 ± 6.93 ^A	83.31 ^A	25.45 ± 6.87 ^A
30% PVP	40	87.5 ^B (35/40)	42.83 ± 7.06 ^B	36.18 ± 7.25 ^B	84.47 ^A	32.78 ± 6.45 ^B
常规法	40	90.0 ^B (36/40)	43.17 ± 6.12 ^B	37.22 ± 6.80 ^B	86.22 ^A	32.97 ± 7.28 ^B

同行数据后所标字母相异表示差异显著($P < 0.05$),所标字母相同表示差异不显著($P > 0.05$)。下表同

Different letters in the same row mean significant difference between the treatments($P < 0.05$), the same letter in the same row means no significant difference between the treatments($P > 0.05$). The same as below

2.2 30%PVP 介导的相同剂量的 FSH 对不同周龄羔羊超排效果比较

采用 30%PVP 缓释 120 IU FSH 分别超排 4~

12 周龄羔羊,4、6 和 8 周龄羔羊平均每只分别可获得可用卵 38.82、34.77 和 33.54 枚,显著高于 12 周龄羔羊组($P<0.05$,表 2)。

表 2 不同周龄羔羊超排效果比较

Table 2 The effect of lamb ages on their superovulation

周龄 Week	羔羊数 No. of lambs	超排反应率/% Rate of lambs response to superovulation	平均卵泡数 No. of follicles per lamb	只均获卵数 No. of follicles picked per lamb	回收率/% Recovery rate	平均可用卵/枚 Available oocytes per lamb
4	10	100.0 ^A (10/10)	51.35±9.48 ^A	43.41±8.23 ^A	84.54 ^A	38.82±8.31 ^A
6	10	90.0 ^A (9/10)	47.30±8.92 ^A	39.55±9.46 ^A	83.62 ^A	34.77±9.25 ^A
8	10	80.0 ^A (8/10)	42.76±6.82 ^A	36.63±6.97 ^A	85.66 ^A	33.54±7.20 ^A
12	10	80.0 ^A (8/10)	29.64±7.90 ^B	24.85±5.50 ^B	83.84 ^A	23.48±5.85 ^B

2.3 30%PVP 介导的相同剂量的 FSH 对道塞特和萨福克羔羊超排效果比较

采用 30%PVP 缓释 120 IU FSH 分别超排道塞

特和萨福克羔羊,道塞特羔羊只均获卵数 37.10 枚,可用 34.35 枚;萨福克羔羊只均获卵数 35.25 枚,可用 31.20 枚(表 3),二者差异不显著($P>0.05$)。

表 3 道塞特和萨福克羔羊超排效果比较

Table 3 Comparison of superovulation efficiency of Poll Dorset and Suffolk lambs

品种 Breed	羔羊数 No. of lambs	超排反应率/% Rate of lambs response to superovulation	平均卵泡数 No. of follicles per lamb	只均获卵数 No. of follicles picked per lamb	回收率/% Recovery rate	平均可用卵/枚 Available oocytes per lamb
道塞特 Dorset	20	90.0 ^A (18/20)	44.35±9.04 ^A	37.10±8.98 ^A	83.65 ^A	34.35±9.37 ^A
萨福克 Suffolk	20	85.0 ^A (17/20)	41.30±8.82 ^A	35.25±8.53 ^A	85.35 ^A	31.20±8.62 ^A

2.4 30%PVP 介导的不同剂量 FSH 羔羊超排效果比较

采用 30%PVP 缓释不同剂量 FSH 进行羔羊超排,40 IU 组平均可用卵数为 19.80 枚,显著低于 80

(32.13 枚)、120(38.72 枚)和 240 IU(40.45 枚)剂量组($P<0.05$),240 IU 剂量组只均获卵数最高,但与 120 IU 剂量组相比差异不显著($P>0.05$,表 4)。

表 4 不同剂量 FSH 羔羊超排效果比较

Table 4 The effect of superovulation of lamb with different dose

剂量/IU Dose	羔羊数 No. of lambs	超排反应率/% Rate of lambs response to superovulation	平均卵泡数 No. of follicles per lamb	只均获卵数 No. of follicles picked per lamb	回收率/% Recovery rate	平均可用卵/枚 Available oocytes per lamb
40	10	80.0 ^A (8/10)	24.85±6.62 ^A	21.25±4.88 ^A	85.51 ^A	19.80±8.31 ^A
80	10	90.0 ^A (9/10)	43.50±8.19 ^B	38.12±7.94 ^B	87.63 ^A	32.13±9.25 ^B
120	10	90.0 ^A (9/10)	50.83±7.24 ^C	41.74±8.27 ^C	82.12 ^A	38.72±7.20 ^C
240	10	90.0 ^A (9/10)	52.17±8.54 ^C	43.58±8.19 ^C	83.53 ^A	40.45±5.85 ^C

2.5 30%PVP 介导的羔羊重复超排效果比较

重复超排后只均获卵数 22.54 枚,可用 17.31

枚,显著低于初次超排($P<0.05$),同时超排成功率也显著下降($P<0.05$,表 5)

表 5 羔羊重复超排效果比较

Table 5 The effect of repeated superovulation of lamb

次数 Frequency	羔羊数 No. of lambs	超排反应率/% Rate of lambs response to superovulation	平均卵泡数 No. of follicles per lamb	只均获卵数 No. of follicles picked per lamb	回收率/% Recovery rate	平均可用卵/枚 Available oocytes per lamb
1	40	87.5 ^A (35/40)	42.83±8.64 ^A	36.18±7.45 ^A	84.50 ^A	32.78±8.90 ^A
2	40	72.5 ^B (29/40)	28.62±5.32 ^B	22.54±6.85 ^B	78.76 ^A	17.31±5.01 ^B

2.6 30%PVP 介导的羔羊活体采集与屠宰场采集的卵母细胞体外发育情况比较

与屠宰场采集的卵母细胞相比,活体采集的羔羊

卵母细胞体外成熟率(86.1%)、卵裂率(78.6%)、桑椹胚率(46.3%)和囊胚率(32.9%)均较低($P < 0.05$),但受精率二者差异不显著($P > 0.05$,表 6)。

表 6 羔羊活体采集与屠宰场采集的卵母细胞体外发育情况比较

Table 6 *In vitro* development of oocytes from lamb and slaughter house

途径 Method	采集可用卵数 No. of available oocytes	体外成熟率/% IVM rate	受精率/% IVF rate	卵裂率/% Cleavage rate	桑椹胚率/% Morula rate	囊胚率/% Blastula rate
30%PVP 活体采卵						
Ovum pick-up under 30%PVP	1 147	86.1 ^A (987/1 147)	80.4 ^A (794/987)	78.6 ^A (624/794)	46.3 ^A (289/624)	32.9 ^A (95/289)
屠宰场采集						
Slaughter house collection	985	95.0 ^B (936/985)	82.9 ^A (776/936)	87.0 ^B (675/776)	54.1 ^B (365/675)	38.4 ^B (140/365)

2.7 羔羊体外受精胚胎冷冻保存与移植

分别冷冻保存了 95 和 140 个羔羊体外受精胚胎与屠宰场体外受精胚胎,复苏后存活率分别为

95.8%和 94.3%,随后进行了胚胎移植,移植后的妊娠率二者差异不显著($P > 0.05$),分别产羔 2 和 7 只(表 7)。

表 7 羔羊体外受精胚胎与屠宰场体外受精胚胎冷冻保存与移植情况比较

Table 7 Cryopreservation and transplantation of IVF embryos from lamb and slaughter house

途径 Method	冷冻囊胚数 No. of cryopreserved blastula	复苏后存活率/% Survival rate after thawed	移植后妊娠率/% Pregnancy rate after transplantation	产羔数/只 No. of lambing
30%PVP 活体采卵				
Ovum pick-up under 30%PVP	95	95.8 ^A (91/95)	20.0 ^A (6/30)	2
屠宰场采集				
Slaughter house collection	140	94.3 ^A (132/140)	27.3 ^A (12/44)	7

3 讨论

3.1 PVP 的缓释作用

PVP 于 1938 年由德国化学家 Dr. W. Reppe

合成。最初将其作为血浆增溶剂使用,后来研究发现其有良好的溶解性、生物相容性、低毒性、成膜性、高分子表面活性、胶体保护能力、与多种不同的化合物形成络合物的能力和对盐、酸及热的稳定性,被广

泛地用于医药、日用化学品和食品加工等众多领域^[6],在注射剂中 PVP 可起到助溶剂和缓释剂的作用。10%~25%的 PVP 溶液对青霉素、胰岛素、水杨酸钠、磺胺噻唑、可的松、对氨基苯甲酸、扑热息痛等药物都有一定的延效作用,已有使用 PVP 为辅料制备长效土霉素的报道^[7]。近年来在这方面已有很多研究,Tantishaiyakul 等研究 K-17 和 K-90 PVP (K 表示 PVP 的粘度)对吡氧噻嗪释放速度的影响,并对 PVP 分子与药物分子间的物理和化学缔合作用进行分析研究^[8-9]。可见 PVP 具有许多优异的性能,还需要开展大量的基础研究工作。

3.2 PVP 在羔羊超数排卵中的应用

国外对羔羊进行激素诱导卵泡发育技术研究较为深入^[10-13],可使每只 1~2 月龄的羔羊平均每次超排获得可用卵母细胞 80~160 枚^[11],但始终没有形成较为标准的超排方法,超排效果不稳定,据 Yamamoto 等报道,将 FSH 溶解在 PVP 中应用,既可提高排卵数,又增加了可移植胚胎的数量^[14]。通过使用 PVP 等缓释剂,用 15% PVP + FSH 200~300 IU,一次注射,超排有效率也可达到 80%,且卵巢上无大卵泡存留^[15]。在本试验中应用 30%的 PVP 溶解 FSH 对羔羊进行超排,可以起到与常规超排一致的效果,超排反应率达到 87.5%,只均获得可用卵母细胞 32.78 枚。在牛^[14]、波尔山羊、波奶杂一代上^[16]有类似的结果,简化了超排程序,FSH 在动物体内的半衰期由 2 h 提高到 3 d,避免了数次注射对动物的应激作用^[14]。

3.3 影响羔羊超排的因素研究

幼羔超排所获可用卵母细胞数量易受供体羔羊品种、年龄等因素影响^[17],在本试验中道塞特和萨福克羔羊的超排效果没有显著差异。不同发育阶段羔羊超排处理后卵巢反应程度差异较大,1 月龄羔羊卵巢反应最为敏感,2~3 月龄较弱,5~7 月龄明显低于 1 月龄。胎儿期及哺乳期营养水平降低会影响羔羊发育,从而显著降低幼羔超排获卵数^[18],因此本研究延迟了羔羊的超排周龄,比较 4~8 周龄和 12 周龄羔羊的超排效果,表明选择 4~8 周龄羔羊进行超排的效果优于 12 周龄羔羊。然而,在我国幼羔超排的最佳年龄是多少,仍待进一步研究。在本试验中针对 FSH 的注射剂量设计了 4 个梯度,40 IU 组只均获卵数显著低于 80、120 和 240 IU 剂量组,240 IU 剂量组只均获卵数最高,但与 120 IU 剂量组相比差异不显著。从经济角度考虑,120 IU

FSH 即可获得良好的超排效果。

幼羔重复超排可以提高每只供体所获卵母细胞总数,从而提高供体遗传资源的利用效率,然而供体羔羊每次超排处理所获卵母细胞数量会随重复超排次数的增加而逐渐减少^[12],本试验间隔 3 周重复超排,结果重复超排幼羔的获卵数较初次超排极显著降低,与上述研究结果一致。Valasi 等^[12]认为卵巢对激素的反应性降低是导致重复超排所获卵母细胞数量下降的主要原因。而在本研究中,手术法采集卵母细胞容易造成卵巢、输卵管及子宫等相互粘连,在一定程度上也会影响卵母细胞采集效果。改进手术采卵方法、降低手术粘连和对卵巢的损伤程度,从而缩短间隔时间,有利于提高利用率。

3.4 羔羊卵母细胞的体外发育潜能

在本研究中活体采集的羔羊卵母细胞体外成熟率、卵裂率、桑椹胚率和囊胚率均低于屠宰场采集的成羊卵母细胞,表明羔羊生产的体外胚胎发育能力较成年羊弱^[19-20],主要在于卵母细胞能否获得正常的受精卵裂及随后的胚胎发育能力,这主要与细胞质的同步成熟有关^[21]。在现行幼畜卵母细胞体外成熟、体外受精系统中,存在着这样一种现象,即幼畜卵母细胞核成熟率很高,而体外受精卵卵裂率较低,这就迫切需要了解经超排处理的羔羊卵巢卵母细胞胞质是否正常和经体外成熟培养后的卵母细胞核质是否成熟等问题,仍需在今后的研究中深入探讨。

4 结论

采用 30% PVP 缓释技术进行羔羊卵泡诱导发育,可以取代常规的递减注射法;年龄、激素剂量和超排次数影响活体采集的卵母细胞数量,4 周龄的道塞特羔羊采用 30% PVP 缓释 120 IU FSH 可得到最高的只均获卵数和可用卵数,活体采集的羔羊卵母细胞可经体外受精和胚胎移植获得后代,具有与屠宰场采集的卵母细胞相同的体外发育能力。

参考文献:

- [1] MARDEN W G R. The hormone control of ovulation in the calf[J]. *Endocrinology*, 1952, 50(4):456-461.
- [2] BLACK W G, ULBERG L C, CHRISTIAN R E, et al. Ovulation and fertilization in the hormone-stimulated calf[J]. *J Dairy Sci*, 1953, 36(3):274-280.
- [3] TASSELL R, CHAMLEY W A, KENNEDY J P.

- Gonadotrophin levels and ovarian development in the neonatal ewe lamb [J]. *Aust J Biol Sci*, 1978, 31: 267-273.
- [4] LAND R B. Number of oocytes present at birth in the ovaries of pure and finnish landrace cross blackface and welsh sheep [J]. *J Reprod Fertil*, 1970, 21: 517-521.
- [5] O'BRIEN J K, DWARTE D, RYAN J P, et al. Developmental capacity, energy metabolism and ultrastructure of mature oocytes from prepubertal and adult sheep [J]. *Reprod Fertil Dev*, 1996, 8(7): 1029-1037.
- [6] AKON H, KAZUNOBU S, MASAHARU H, et al. Chemically modified polysulfone hollow fibers with vinylpyrrolidone having improved blood compatibility [J]. *Biomaterials*, 2002, 23: 2659-2666.
- [7] 简载华. 兽药制剂生产与应用手册[M]. 南昌:江西科学技术出版社, 1994: 291.
- [8] TANTISHAIYAKUL V, KAEWNOPPARAT N, INGKATAWORNWONG S. Properties of solid dispersions of piroxicam in polyvinyl pyrrolidone [J]. *Int J Pharm*, 1999, 181: 143-151.
- [9] CRAIG D Q M. The mechanisms of drug release from solid dispersions in water soluble polymers [J]. *Int J Pharm*, 2002, 231(2): 131-144.
- [10] LEDDA S, BOGLIOLO L, LEONI G, et al. Production and lambing rate of blastocysts derived from in vitro matured oocytes after gonadotropin treatment of prepubertal ewes [J]. *J Anim Sci*, 1999, 77: 2234-2239.
- [11] KELLY J M, KLEEMANN D O, WALKER S K. Enhanced efficiency in the production of offspring from 4- to 8-week-old lambs [J]. *Theriogenology*, 2005, 63: 1876-1890.
- [12] VALASI I, LEONTIDES L, PAPANIKOLAOU T, et al. Age, FSH dose and follicular aspiration frequency affect oocyte yield from juvenile donor lambs [J]. *Reprod Dom Anim*, 2007, 42(3): 230-237.
- [13] KOEMA J, KEEFER C L, BALDASSARRE H, et al. Developmental competence of prepubertal and adult goat oocytes cultured in semi-defined media following laparoscopic recovery [J]. *Theriogenology*, 2003, 60: 879-889.
- [14] YAMAMOTO M, OOE M, KAWAGUCHI M, et al. Superovulation in the cow with a single intramuscular injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone [J]. *Theriogenology*, 1994, 41(3): 747-755.
- [15] 曾培坚, 石国庆, 皮文辉, 等. 用聚乙烯吡咯烷酮加FSH制剂对绵羊一次注射超排效果试验 [J]. 中国养羊, 1996, 16(4): 26.
- [16] 王希朝, 王光亚, 赵晓娥. 布尔山羊和布奶一代山羊超数排卵试验 [J]. 动物医学进展, 1999, 20(2): 40-42.
- [17] MORTON K M, CATT S L, MAXWELL W M, et al. Effects of lamb age, hormone stimulation and response to hormone stimulation on the yield and in vitro developmental competence of prepubertal lamb oocytes [J]. *Reprod Fertil Dev*, 2005a, 17: 593-601.
- [18] KELLY J M, KLEEMANN D O, WALKER S K. The effect of nutrition during pregnancy on the in vitro production of embryos from resulting lambs [J]. *Theriogenology*, 2005b, 63: 2020-2031.
- [19] MORON K M, CATT S L, MAXWELL W M, et al. In vitro and in vivo developmental capabilities and kinetics of in vitro development of in vitro matured oocytes from adult, unstimulated and hormone-stimulated prepubertal ewes [J]. *Theriogenology*, 2005b, 64: 1320-1332.
- [20] LEONI G G, SUCCU S, BERLINGUER F, et al. Delay on the in vitro kinetic development of prepubertal ovine embryos [J]. *Anim Reprod Sci*, 2006, 92(3-4): 373-383.
- [21] CROZET N. Manipulation of oocytes and in vitro fertilization [J]. *J Reprod Fertil Suppl*, 1991, 43: 235-243.

(编辑 郭云雁)