

家兔精子体外获能与体外受精试验*

徐 君 钱菊汾 张 涌 王建辰

(兽 医 系)

摘 要 本试验目的在于建立一种简便而有效的系统,能使家兔射出的精子完成体外获能,并获得体外受精、早期卵裂和正常产仔。精子体外获能采用三种方法:A.HIS(15 min)+DM(1~2h);B.HIS(15min)+DM(11~12h);C.m-HIS(15 min)+m-DM(2~4h)。经上述方法处理的精子与512枚输卵管卵母细胞进行体外受精和体外培养的结果表明,A组的受精和早期卵裂发育延迟;B组的受精卵大都停留在原核期;C组的受精和早期卵裂发育正常。将C组60枚2-4细胞移植至9只受体兔,5只妊娠,其中2只产4只试管仔兔,另外3只获得12个胎儿。

主题词 卵体外受精/精子体外获能, 试管动物, 试管兔

体外受精技术是胚胎移植的一项重要延伸技术,它能提供大量受精卵,还能治疗某些不孕症,在畜牧业和医学等领域有着广阔的应用前景。本世纪80年代以来,此项技术得到了迅速发展。到目前为止,国外已有10种哺乳动物(家兔、小白鼠、大白鼠、牛、猪、恒河猴、狒狒、绵羊、猕猴、山羊)和人通过体外受精获得了试管后代^[1]。国内范必勤等首次在家兔上采用精子体内获能方法获得了仔兔^[2]。但尚未见到采用精子体外获能方法得到仔兔的报道。Brachett *et al.*对家兔精子体外获能多年的研究中建立了高离子强度液(HIS)配合特定培养液(DM)的精子体外获能系统,提出家兔可作为体外受精研究的模型动物^[3-6]。但受精卵的妊娠率较低,产仔数少。本研究在Brachett方法的基础上加以改良,建立了简便而更为有效的精子体外获能系统,为家畜的体外受精技术提供了理论和实践依据。

1 材料和方法

1.1 试验动物

供体与受体为当地杂种或比利时纯种家兔,6月龄至2.5岁,健康。成年公兔2只(1号为比利时,2号为新西兰)。在自然光照、自由采食和饮水条件下单笼饲养。购买的母兔饲养30d后用于实验。

1.2 试剂

FSH(武汉生化制药厂,批号840303;宁波市激素制品厂,批号881020,890304);LH(产地同上,前者批号840301,后者批号881020,890304);特定培养液(简称DM,

文稿收到日期:1989-07-10。

*高等学校博士学科点科研基金和扬陵农业科技开发基金资助项目。

自配,其成分为:112.0 mM NaCl, 4.02 mM KCl, 2.25 mM CaCl₂ · 2H₂O, 0.85 mM NaH₂PO₄ · H₂O, 0.52 mM MgCl₂ · 6H₂O, 37.0 mM NaHCO₃, 13.9 葡萄糖, 1.25 mM 丙酮酸钠, 3.0 mg 牛血清白蛋白/mL (serva进口分装,批号871114), 0.031 mg 青霉素钠盐/mL, 高离子强度液(简称HIS,自配:在10 mL DM中加31.0 mL NaCl,渗透压约380毫渗量/kg);改良的特定培养液(简称m-DM,自配:在100 mL DM中加84 mg NaHCO₃);改良的高离子强度液(简称m-HIS,自配:在10 mL m-DM中加34 mg NaCl);Ham's F₁₀ (美国底特律,批号:704124,用于配制胚胎培养液);家兔血清(自制,用于配制受精卵培养液)。

1.3 精子体外获能处理

用自制的假阴道采回公兔精液。1号、2号公兔的新鲜精液活力为0.9级,精子浓度为 $1 \sim 8 \times 10^7$ / mL。精子体外获能处理采用三种方法:A.用HIS处理15 min,并在DM液中培养 $1 \sim 2$ h^[3];B.用HIS处理15 min,并在DM液中培养 $11 \sim 12$ h^[6];C.用m-HIS处理15 min,并在m-DM液中培养 $2 \sim 4$ h。以上处理和培养,均在38℃的CO₂培养箱中(5% CO₂空气、100%湿度)进行。获能处理完毕,观察精子活力和测定精子浓度。其活力变为0.6~0.8级,浓度为 $2 \sim 7 \times 10^6$ / mL。获能的精子在实体显微镜下呈现活泼的直线运动。

1.4 超排及卵母细胞的回收

用FSH+LH进行超排。FSH分6次注射,总剂量为80 IU,最后一次注射FSH 12 h后,耳静脉注射LH 80 IU。注射LH 12.5 h后,将供体母兔剖腹,剪取输卵管,用DM或m-DM冲洗输卵管,在实体显微镜下检出卵丘-卵母细胞复合体。

1.5 体外授精及受精卵的继续培养

将回收的卵丘-卵母细胞复合体与体外获能精子在DM或m-DM液中,覆盖石蜡油,置38℃ CO₂培养箱中培养。授精时精子浓度调为 $2 \sim 8 \times 10^5$ / mL。分A, B, C三组授精,与三种体外获能方法相对应。精、卵共同培养 $6 \sim 10$ h后,将全部卵细胞移入含有20%灭活自体兔血清的DM或m-DM中继续培养,观察受精卵的发育情况。记录受精卵数。受精卵的标志是可见雌、雄原核,并排出第二极体,或已发育到早卵裂期胚胎。

1.6 早期胚胎培养和移植

将发育到2-4-细胞的胚胎,一部分移入Ham's F₁₀+1.5% BSA的胚胎培养液中,观察其体外继续发育情况。一部分则移植入同期发情受体母兔输卵管内。移植两周后,通过触诊或剖腹探查,确定其妊娠情况。

2 结果与讨论

2.1 体外受精结果

用A, B, C三种方法获能的精子与512枚输卵管回收的卵母细胞进行体外受精,结果三组受精率分别为:A. 51.3%(38/74), B. 49.3%(37/75), C. 63.4%(230/363)。C组的受精率显著地高于B组($P < 0.05$),表明C组精子的获能效果比B组的好。

2.2 受精卵的发育率和发育时程

2.2.1 发育率 从表1可见, A, B, C三组受精卵达到2-4-细胞的发育率分别为63.2%

(24/38), 10.8%(4/37)和55.7%(128/230)。B组的发育率明显低于A,C两组。

表1 三组受精卵的发育率和发育时程

	受精卵数(枚)			发育率(%)			发育时程(h)		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
原核期	14	33	102	36.8	89.2	44.3	20~25	12~18	10~15
2-4-细胞	24	4	128	63.2	10.8	55.7	25~32	24~26 ⁽¹⁾	22~26

注: (1) 2~3-细胞期。

2.2.2 发育时程 据加藤浩等报道,家兔交配后体内受精卵的正常发育时程,原核期为22h,2-4-细胞期为22~32h^[6]。通常,家兔交配后10~14h排卵(Heope, 1905)。因此,体内受精卵的发育时程,从排卵后计算,原核期为8~12h,2-4-细胞期为12~28h,从表1可见,本试验结果,A组原核期和早期卵裂的发育时程分别为20~25h和25~32h,与体内发育相比,明显延迟,这与Brackett *et al.*报道的结果^[3]相一致。B组的原核期和早期卵裂发育时程分别为12~18h和24~26h,与体内发育相比,基本接近正常,但这组的发育率很低(10.8%),绝大多数受精卵(89.2%)仅仅停留在原核期,而缺乏进一步发育的潜力,而且受精卵的质量也差。这与Brackett *et al.*报道的结果相反。他们证明延长HIS处理后的精子培养时间(在DM中达12h或更长),其体外获能、体外受精和体外发育效果与体内的相近似^[6]。可能是由于家兔的品种和精子获能处理等具体条件的不同所致,尚需进一步研究。C组的原核期和早期卵裂发育时程分别为10~15h和22~26h,很接近于体内正常的发育情况,而且达到2-4-细胞的发育率较高(55.7%),受精卵的质量也较好(图1~3)。

根据以上结果分析,我们认为C组的精子获能系统(m-HIS 15 min + m-DM 2~4 h)能明显改善A, B两组精子的体外获能、体外受精和早期卵裂的效果,而且体外受精卵的发育情况与体内的相类似。

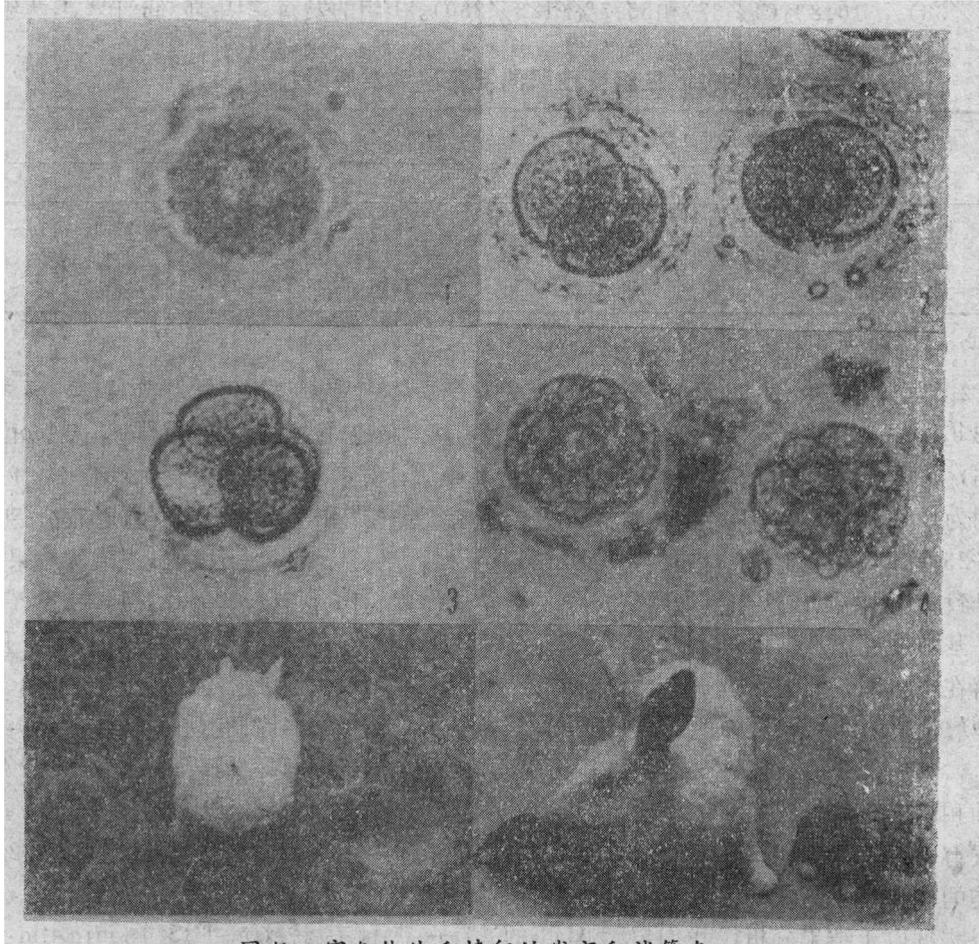
2.3 早期胚胎体外培养或移植

为了进一步证明C组受精卵在体内、外的进一步发育潜力,我们用Ham's F₁₀ + 1.5% BSA培养液培养2-细胞1枚,4-细胞4枚,结果均先后发育为桑椹胚,发育良好(图4)。另将60枚2-4-细胞手术移植到9只同期发情受体兔的输卵管内,结果5只妊娠(表2),妊娠率为55.6%(5/9),明显高于Brackett同类结果[33.3%(2/6)]^[5]。其中3只经剖腹探查,均在移植侧子宫内妊娠(图8),共获得胎儿12个;另2只受体妊娠期满,产4只健康仔兔。产后一个月内幼兔的生长发育良好(图5~6)。

以上结果进一步证明,m-HIS 15 min + m-DM 2~4h是一种快速、简便而更为有效的精子体外获能系统,用这种方法获能的精子与输卵管卵母细胞进行体外受精后,获得的早期胚胎能继续在体外正常发育,移植后能正常妊娠并产仔。

2.4 碳酸氢钠对精子获能、顶体反应和受精等作用机理

我们用增加碳酸氢钠改良Brackett的HIS + DM精子体外获能系统,已看出对精子获



图版 家兔体外受精卵的发育和试管兔

- 1.原核期；2,2-细胞；3,4-细胞；4.桑椹胚；
- 5,4号受体与第一对“试管兔”（30日龄，1989.4.28生）；
- 6,8号受体与第二对“试管兔”（11日龄，1989.5.18生）

能、体外受精和卵裂等有明显的促进作用，其促进作用与碳酸氢根离子有关。已知 HCO_3^- 是兔输卵管液中的去卵丘因子，并有利于精子穿过透明带。 HCO_3^- 还可以刺激精子呼吸^[7]，促进精子活动。缺乏 $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ 时，小鼠受精卵不能卵裂^[8]。Collado认为碳酸酐酶是体内获能剂，是通过 HCO_3^- 而发生获能作用的。

HCO_3^- 是通过 $\text{CO}_2\text{H}/\text{CO}_3^-$ 来调节细胞内外的pH值以促进精子顶体反应和早期卵裂的发生。Dan证明，提高细胞外pH可大大地增加精子顶体反应的数量。Carney发现 $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ 对调节细胞内的pH是必需的，对于早卵裂期的胚胎发育来说，10% CO_2 明显优于5% CO_2 ^[9]。此外， CO_2 对精子细胞内的丙酮酸盐向草酰乙酸盐的转化也有促进作用，生成的草酰乙酸可重新进入三羧循环中，生成ATP。ATP通过存在于精子质膜和顶体膜中的腺苷酸环化酶又生成cAMP，增加细胞内cAMP的含量，激发顶体反应的发生^[10]。

Na^+ 对顶体反应也很重要。根据对两栖类的实验发现，当诱发精子产生顶体反应

表2 胚胎移植、妊娠和产仔情况

受体兔号	移植胚胎数	胚胎发育时期		妊娠	妊娠天数	剖腹探查			仔兔		
		2-细胞	4-细胞			胎儿数	正常	停止发育	数量	性别	生长发育
1	12	2	10	+	15	5		+			
2	12		12	-1)							
3	4		4	+	16	4	+				
4	4		4	+	29				2	1♂ 1♀	正常
5	8	2	6	+	13	3	+				
6	6	2	4	-2)							
7	5	3	2	-3)							
8	5	1	4	+	30				2	1♂ 1♀	正常
9	4	2	2	-4)							
总计	60	12	48			12			4		

注: 1) 移植后第20天, 受体拔毛, 第41天剖检, 在移植侧子宫近基部有性质不明的黄豆大肉样块状物一个。

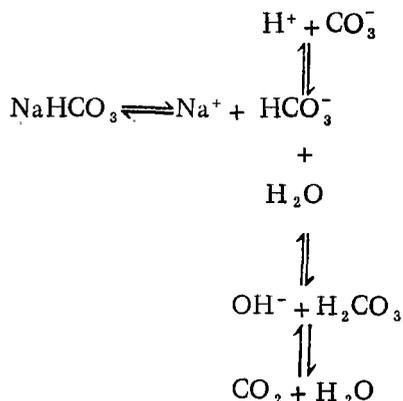
2) 因腹腔内感染, 于移植后第12天受体死亡, 剖检, 未孕。

3) 伤口感染, 移植后第19天拔毛, 第26天剖检, 未孕。

4) 前一只受体在移植临结束时死亡, 立即回收其受精卵, 第二次移植给86号受体。移植后第26天拔毛, 剖检, 未孕。

时, 迅速吸收 Na^+ , 同时释放 H^+ , 两者的比例为1:1 (Schachmann *et al.*, 1981)。Lee *et al.* 也证明, 增加 Na^+ 可促进精子运动, 同时释放 H^+ ; 如缺少 Na^+ , 精子则停止运动, 并且不释放 H^+ [11]。

NaHCO_3 在培养基中存在着一种动态平衡过程:



在此动态平衡过程中, 既可以保证精子顶体反应时对 Na^+ 的需求, 又可以保证释放的 H^+ 和 OH^- 不至于明显改变培养基的pH值, 即具有一定的缓冲作用; 还可保证三羧循环过程中对 CO_2 的需求。看来, 碳酸氢钠对精子获能、顶体反应和受精等的促进作用是一种综合性效应, 孕育于上述的动态平衡之中。

- 1 张继慈等译. 家畜生物技术. 乌鲁木齐: 新疆人民出版社, 1989. 90~91
- 2 范必勤, B G. 勃拉吉特等. 家兔体外受精研究. 江苏农业学报, 1987, 3: 11~8.
- 3 Brackett B G, Oliphant G. Capacitation of Rabbit Spermatozoa in Vitro. *Biol. Reprod.*, 1975, 12: 260~274
- 4 Brackett B G, Mills J, Jeitles G G. In Vitro Fertilization of Rabbit Ova Recovered from Ovarian Follicles. *Fertil. Steril.*, 1972, 23: 898
- 5 Brackett B G, Rousquet D, Dressel M A. In Vitro Sperm Capacitation and in Vitro Fertilization with Normal Development in the Rabbit. *J. Androl.*, 1982, 3: 402~411
- 6 加藤浩/星, 修三/西川义正. 新家畜繁殖讲座, 基础编 I. 东京: 朝仓书店, 1970. 85
- 7 竹内三郎. 哺乳动物卵 (14), 畜产研究, 1976, 30: 8
- 8 Qiunn P, Walos R G. Growth and Metabolism of Preimplantation Mouse Embryos, Cultured in Phosphate-Buffered Medium. *J. Reprod. Fertil.*, 1973, 35: 289~300
- 9 Carney E W, Bavister B D. Increased Atmospheric Carbon Dioxide Stimulates Hamster Embryo Development in Vitro. *Biol. Reprod.*, 1986, 34. Suppl 1: 199
- 10 北京医学院主编. 生物化学. 北京: 人民卫生出版社, 1978. 39, 112
- 11 丁汉波, 全允彬, 黄浙. 发育生物学. 北京: 高等教育出版社, 1987. 113~162

Experiments on in Vitro Capacitation of Ejaculated Sperm and in Vitro Fertilization in Rabbit

Xu Jun Qian Jufen Zhang Yong Wang Jianchen

(Department of Veterinary Medicine)

Abstract The purpose of this research was to establish an available simplified method that would enable ejaculated rabbit sperm to complete in vitro capacitation and to obtain in vitro fertilization, early cleavage and normal offspring of rabbit ova. In vitro capacitation of sperm was carried out by using three methods, A. in high ionic strength solution followed by preincubation in defined medium for 1~2 hours; B. in HIS followed by preincubation in DM for 11~12 hours; C. in m-HIS (10 mL m-DM + 34 mg NaCl) followed by preincubation in m-DM (100 mL DM + 84mg NaHCO₃) for 2~4 hours. Five hundred and twelve oocytes were cocultured in DM or m-DM with above three kinds of capacitated sperms. The fertilization and early cleavage were retarded in group A, the fertilization ova almost stayed in pronucleus period in group B, good result of fertilization and early cleavage were obtained in group C. Sixty 2-4 cell embryos from group C were transferred into nine recipients, five of which became pregnant. Four embryos were carried successfully to deliver normal offspring by two recipients. Laparotomies were performed in three recipients to assess implantation about two weeks after embryo transfer, and twelve embryos were implanted.

Subject words in vitro fertilization of ova/in vitro capacitation of sperm, test-tube animal, test-tube rabbit.