

不同直径卵泡对猪卵母细胞体外成熟的影响*

陈晓宇^{1,2}, 李青旺^{1,2}, 胡建宏², 王立强², 张德福³, 卜书海², 韩增胜^{1,2}

(1 燕山大学 环境与化学工程学院, 河北 秦皇岛 610400;

2 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100;

3 上海市农业遗传育种重点实验室, 上海 201106)

[摘要] 以 TCM-199 成熟培养猪卵巢表面直径 2~3 mm, 3~5 mm 和 5~8 mm 卵泡内的卵母细胞, 比较了成熟培养液中添加以上各组卵泡液(pFF)对猪卵母细胞体外成熟(NM)的影响, 以成熟培养 48 h 后排出第一极体为成熟标准对猪卵母细胞进行成熟鉴定。结果表明, 2~3 mm, 5~8 mm 和 3~5 mm 3 组卵泡内卵母细胞的体外成熟(NM)率依次升高, 分别为 12.7%, 31.3% 和 46.0%, 各组间差异显著($P < 0.05$); 添加 3~5 mm 卵泡液的卵母细胞体外成熟率(42.0%)也显著高于 5~8 mm 组(11.0%)和 2~3 mm 组(12.7%)($P < 0.05$)。试验同时观察记录了不同直径卵泡内卵母细胞的等级, 结果发现 5~8 mm 组中 A 级卵母细胞的比例(37.7%)显著高于 3~5 mm 组(23.9%)($P < 0.01$), 但其 B 级卵母细胞的比例(45.9%)却显著低于 2~3 mm (62.1%)组和 3~5 mm (59.2%) ($P < 0.05$)。这说明, 2~3 mm, 3~5 mm 和 5~8 mm 3 组卵泡中, 卵泡直径增大, 其在猪卵母细胞体外成熟中的优势渐增。

[关键词] 猪; 卵泡; 卵母细胞; 体外成熟

[中图分类号] S828.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)07-0007-04

卵泡作为哺乳动物卵母细胞发生、生长和成熟的环境, 其对卵母细胞的成熟起着至关重要的调节作用。Ding 等^[1]报道, 卵泡大小与其内部卵母细胞的发育能力密切相关, 而且卵母细胞等级对其体外成熟(*in vitro* maturation, NM)也有很大影响。所以研究卵泡大小对 NM 的影响, 有助于深入了解卵母细胞发育与周围环境间的关系, 进一步提高体外成熟效果。目前, 国内只有韩毅冰等^[2]和钱云等^[3]报道了猪卵泡大小对卵母细胞发育的影响, 所以很有必要对其做进一步的研究。本研究分析了卵泡大小对卵母细胞等级和 NM 率的影响, 并进行了猪卵泡液(pFF)对猪卵母细胞体外成熟作用的比较研究, 以期对卵母细胞的成功培养提供参考。

1 材料与方法

1.1 卵巢采集

剪下屠宰场刚刚废弃的卵巢, 放入加有青、链霉素双抗的灭菌生理盐水(35~38℃), 2 h 内送回实验室。用等温生理盐水冲洗卵巢 2~3 次, 剪去卵巢上附带的输卵管和系膜, 用灭菌吸水纸吸干备用。

1.2 卵母细胞的采集与猪卵泡液(pFF)的制备

按直径将卵泡分为 2~3 mm, 3~5 mm 和 5~8 mm 3 组, 分别抽取各组卵泡液置于灭菌试管中, 静置 15 min 后镜下捡卵。取静置上清液若干, 3 000~3 500 r/min 离心 30 min, 制备试验用 pFF; 将所得卵母细胞分为 A, B, C 3 级, 分级标准见文献[4]。

1.3 卵母细胞的 NM 及成熟鉴定

在 38.5℃, 体积分数 5% CO₂, 饱和湿度下体外成熟培养猪卵母细胞, 48 h 后统计卵丘扩散率, 再将细胞移至 3 mg/mL 透明质酸酶中脱去卵丘细胞, 显微镜下观察统计第一极体(Pb I)的排出率。

1.4 试验设计

1.4.1 卵泡直径对卵母细胞等级的影响 分别统计不同直径组各级卵母细胞比例, 比较卵泡大小对卵母细胞等级的影响。

1.4.2 卵泡直径对卵母细胞 NM 的影响 以“TCM-199+10 IU/mL PMSG(孕马血清促性腺激素)+10 IU/mL HCG(人绒毛膜促性腺激素)+体积分数 10% NCS(犊牛血清)+体积分数 10% pFF”为体外成熟液, 对 A, B 级卵母细胞进行 NM, 比较

* [收稿日期] 2003-06-07

[基金项目] 上海市科学技术委员会基金资助课题(014909005)

[作者简介] 陈晓宇(1975-), 男, 内蒙古乌盟人, 在读博士, 主要从事动物生殖调控技术研究。E-mail: cxy.v@sina.com

[通讯作者] 李青旺(1956-), 男, 陕西西乡人, 教授, 博士生导师, 主要从事动物生殖生理与调控技术研究。

卵泡大小对卵母细胞体外成熟的影响

1.4.3 不同直径卵泡中卵泡液对 NM 的影响 分别以不同直径卵泡内的 pFF, 替换上述培养基中 pFF, 对卵母细胞进行体外培养, 比较不同直径卵泡液对 NM 的影响。

1.5 数据处理

所得数据以 *t* 检验法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 卵泡直径对卵母细胞等级的影响

由表 1 可知, 直径 5~8 mm 的卵泡中可采集的 A 级卵母细胞比例显著优于 3~5 mm 组, 2~3 mm 组中的 A 级卵母细胞比例与 5~8 mm 组差异不显

著 ($P > 0.05$); 2~3 mm 组和 3~5 mm 组所获 B 级卵母细胞比例显著高于 5~8 mm 组 ($P < 0.05$), 但 2~3 mm 组与 3~5 mm 组间差异不显著 ($P > 0.05$); 3~5 mm 组所获 C 级卵母细胞比例显著高于其余 2 组 ($P < 0.05$), 但 2~3 mm 组与 5~8 mm 组间无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.2 卵泡直径对卵母细胞 NM 的影响

由表 2 知, 体外成熟时 5~8 mm 组和 3~5 mm 组卵母细胞的扩散率差异不显著 ($P > 0.05$), 但两者都极显著高于 2~3 mm 组 ($P < 0.01$)。在 Pb I 排出率上, 3~5 mm 组, 2~3 mm 组和 5~8 mm 组间差异极显著 ($P < 0.01$)。

表 1 不同直径卵泡对卵母细胞等级的影响

Table 1 Effect of follicle with different diameters on oocytes

卵泡直径/mm Diameter	卵巢数(卵母细胞数) Ovaries(oocytes)	A 级卵母细胞比例/% Class A oocytes	B 级卵母细胞比例/% Class B oocytes	C 级卵母细胞比例/% Class C oocytes
2~3	90(116)	28.4(33)bc	62.1(72)d	9.5(11)e
3~5	90(184)	23.9(44)bB	59.2(109)d	16.8(31)f
5~8	90(61)	37.7(23)cA	45.9(28)c	10.4(10)e

注: 同列数据后不同小写字母者表示差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写母者表示差异极显著 ($P < 0.01$)。下表同。

Note: Percentages with different small letters are significantly different ($P < 0.05$) and values with different capital letters indicate significance at 0.01 levels respectively ($P < 0.01$) in same columns. It is the same in the following table.

表 2 不同直径卵泡卵母细胞对 NM 的影响

Table 2 Effect of oocytes with different diameter from porcine follicles on NM

卵泡直径/mm Diameter	培养卵母细胞数 No. of treated oocytes	卵丘扩散率/% Cumulus expanded	Pb I 排出率/% Pb I excluded
2~3	102	63.7(65)B	12.7(13)C
3~5	250	92.0(230)a	46.0(115)B
5~8	285	95.7(177)a	31.3(58)A

2.3 不同直径卵泡中卵泡液对猪卵母细胞体外成熟的影响

由表 3 可以看出, 2~3 mm 组卵丘扩散率显著高于其余 2 组 ($P < 0.01$), 5~8 mm 组也显著高于 3

~5 mm 组 ($P < 0.01$)。3 组的 Pb I 排出率分别为 11.0%, 42.0% 和 13.0%, 5~8 mm 组与 2~3 mm 组间无差异 ($P > 0.05$), 3~5 mm 组显著高于其他 2 组 ($P < 0.01$)。

表 3 不同直径卵泡液对 NM 的影响

Table 3 Effect of pFF from follicles of different diameters on NM

卵泡直径/mm Diameter	培养卵母细胞数 No. of treated oocytes	卵丘扩散率/% Cumulus expanded	Pb I 排出率/% Pb I excluded
2~3	100	98.0(98)A	13.0(13)Aa
3~5	200	70.5(141)Ba	42.0(84)B
5~8	100	87.0(87)Bb	11.0(11)Aa

3 讨论

3.1 卵泡直径对卵母细胞等级的影响

5~8 mm 组中 A 级卵母细胞比例显著高于其余 2 组, 但其 B 级比例却最低。3~5 mm 组中 A 级卵母细胞比例显著高于 2~3 mm 组, 两组间 B 级卵

的比例却无显著差异; 且 3~5 mm 组中 C 级卵比例显著高于其余 2 组, 而 5~8 mm 组与 2~3 mm 组中 C 级卵比例无显著差异。这一结果表明, 随着卵泡的生长发育, A 级卵母细胞的比例不断上升, B 级卵母细胞的比例则有下降趋势。Motlik 等^[5]曾报道, 猪卵泡卵母细胞的减数分裂能力是在卵泡生长

中逐步获得的,这种能力表现在A、B级卵母细胞比例的增加上。本试验中,B级卵母细胞下降可能是部分B级卵退化为C级卵所致,而A级卵母细胞保持上升,其原因与抽吸采卵中大直径卵泡内的复合体受损较小有关。

3.2 卵泡直径大小对卵母细胞IVM的影响

Eppig^[6]曾报道,哺乳动物的卵母细胞随卵泡的发育同步发育生长。本研究表明,虽然5~8mm和3~5mm组内卵母细胞的卵丘扩散率均显著高于2~3mm组,但前两者之间无差异。在Pb I排出率上,3~5mm组卵泡卵母细胞优于其余两组,同时5~8mm组高于2~3mm组。本研究表明,随着卵泡的变大,卵丘扩散能力逐步加强,这应该与卵丘-卵母细胞复合体(COCs)上HCG或LH的受体分布有关。随着卵泡增大,COCs上的激素受体由内膜细胞逐渐向颗粒细胞转移^[7]。有报道^[8]显示,在此过程中,卵丘细胞会依赖其自身的扩展程度产生一种促卵母细胞成熟因子,同时卵丘的扩展也可解除成熟分裂抑制因子(OMI)对卵母细胞的束缚。但Pb I排出能力却以3~5mm组中的卵母细胞为最佳,猪卵泡直径过大或过小,卵母细胞成熟能力均降低。此结论与秦鹏春等^[9],Eppig^[6]和钱云等^[3]的报道有所不同,这可能是卵泡内卵母细胞处于不一致的卵龄所致,大卵泡内的细胞已成熟或过成熟,小卵泡内细胞却未发育成熟,只有3~5mm组卵泡的卵母细胞是

生长旺盛期,适宜IVM。

3.3 不同直径卵泡中卵泡液对IVM的影响

猪卵母细胞直径达0.4~0.8mm时出现卵泡腔,腔内卵泡液中一些代谢物质促进了卵母细胞质的成熟。本试验结果表明,添加5~8mm和2~3mm组卵泡液,卵丘细胞的扩散率优于添加3~5mm组卵泡液,但3~5mm组中,卵细胞的Pb I排出率显著高于其余2组,Marchal等^[10]也有类似报道。这应该与卵泡液内积累的生化物质有关,可能是由于3~5mm组卵泡内的卵母细胞正处于由M I期向M II期转化的阶段(极体排出前夕),pFF中较高水平的成熟促进因子(MPF)发挥了作用。

因卵龄的差异,在IVM培养过程中,不同直径卵泡卵母细胞常表现出核、质成熟的不统一,也就造成了成熟率的不稳定。这种差异具体表现为卵母细胞体外成熟48h后,卵丘扩散率和Pb I排出率之间较大的差异,其实质则是由于不同卵龄卵母细胞GV期和M II期所受阻滞不同造成的,而卵龄的差异通常以卵泡直径的大小作为判断标准。除此之外,卵母细胞体外成熟体系的不完善仍是影响成熟率高低的一个重要原因。所以,以不同培养液分组培养不同直径范围内的猪卵母细胞,继续改良体外培养体系,值得在日后的研究中作进一步的探讨和分析。

[参考文献]

- [1] Ding J, Foxcroft G R. Conditioned media produced by follicular shells of different maturity affect maturation of pig oocytes[J]. *Biol Reprod*, 1994, 50(6): 1377- 1384
- [2] 韩毅冰, 施维民, 秦鹏春. 猪不同直径卵泡中卵母细胞体外培养的成熟能力[J]. *中国兽医学报*, 2000, 20(2): 183- 187
- [3] 钱云, 师蔚群, 朱猛进, 等. 卵泡内环境对猪卵泡卵母细胞体外成熟和发育的影响[J]. *生命科学研究*, 2001, 5(2): 114- 119
- [4] 吴光明, 秦鹏春, 谭景和, 等. 体外成熟猪卵母细胞的体外受精研究[J]. *东北农业大学学报*, 1996, 27(2): 190- 195
- [5] Motlik J, Crozet N, Fulka J. Meiotic competence *in vitro* of pig oocytes isolated from early antra follicles[J]. *J Reprod Fert*, 1984, 72(2): 323- 328
- [6] Eppig J J. A analysis of mouse oogenesis *in vitro*. Oocyte isolation and the utilization of exogenous energy sources by growing oocytes[J]. *J Exp Zool*, 1997, 198: 375- 381
- [7] Yuan W, Lucy M C, Smith M F. Messenger ribonucleic acid for insulin-like growth factor-1 and factor-2, insulin-like growth factor binding protein-2, gonadotropin receptors and steroidogenic enzyme in porcine follicles[J]. *Biol Reprod*, 1996, 55: 1045- 1054
- [8] Byskov A G, Andersen C Y, Hossaini A, et al. Cumulus cells of oocyte-cumulus complexes secrete a meiosis-activating substance when stimulated with FSH[J]. *Mol Reprod Dev*, 1997, 46: 296- 305
- [9] 秦鹏春, 谭景和, 吴光明, 等. 猪卵巢卵母细胞体外成熟与体外受精的研究[J]. *中国农业科学*, 1995, 28(3): 58- 66
- [10] Marchal R, Vigneron C, Perreau C, et al. Effect of follicular size on meiotic and developmental competence of porcine oocytes[J]. *Theriogenology*, 2002, 57: 1523- 1532

Effect of follicles with different diameters on porcine oocyte *in vitro* mature

CHEN Xiao-yu^{1,2}, LI Qing-Wang^{1,2}, HU Jian-hong², WANG Li-qiang²,
ZHANG De-fu³, PU Shu-ha¹, HAN Zeng-sheng^{1,2}

(1 College of Environment and Chemistry Engineering, Yanshan University, Qinhuangdao, Hebei 610400, China;

2 College of Animal Science and Technology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

3 Shanghai Municipal Key Laboratory of Animal and Breeding, Shanghai 201106, China)

Abstract: Porcine oocytes from follicles in diameters of 2- 3 mm, 3- 5 mm and 5- 8 mm were matured *in vitro* in TCM -199 and the effects of pFF from the above groups on the *in vitro* maturation (VM) during maturing were compared. The matured oocytes were certified if the Pb I excluded after 48 hour's maturing. The results were as follows: the *in vitro* maturation (VM) rates of porcine oocytes derived from follicles in diameters of 2- 3 mm, 5- 8 mm and 3- 5 mm were increased gradually, the rates were 12.7%, 31.3% and 46.0% respectively and the difference between them was significant ($P < 0.05$); The rates of matured oocytes with pFF from 3- 5 mm group (42.0%) was significantly higher than that from 2- 3 mm group (12.7%) and 5- 8 mm group (11.0%) ($P < 0.01$); The oocyte classes from different diameters follicles were observed and recorded, the proportion of class A oocytes in 5- 8 mm group (37.7%) was significantly higher than that from 3- 5 mm group (23.9%), but the proportion of class B in 5- 8 mm group was lower than that in 2- 3 mm (62.1%) and 3- 5 mm (59.2%) ($P < 0.05$). The results indicated that the superiority of porcine follicle in diameters of 2- 3 mm, 5- 8 mm and 3- 5 mm increased gradually *in vitro* maturation of porcine oocytes.

Key words: porcine; follicle; oocyte; *in vitro* maturation

· 简 讯 ·

“雷公藤杀虫作用研究”通过教育部组织的成果鉴定

由西北农林科技大学无公害农药研究服务中心博士生导师张兴教授主持的“雷公藤杀虫作用研究”，于2004年4月27日通过了由教育部组织、委托西北农林科技大学主持的技术成果鉴定。该项目(1)首次系统地研究了雷公藤的杀虫作用，发现其对菜青虫、小菜蛾等主要农业害虫具有触杀、胃毒、拒食、麻痹、杀卵、抑制生长发育等活性；(2)发现一新的二萜类化合物雷酚 δ 内酯甲醚；(3)首次发现并报道了雷公藤新碱的杀虫活性；(4)首次证实了雷公藤中二萜类化合物雷公藤内酯酮和雷公藤甲素具有杀虫活性；(5)初步阐明雷公藤甲素对粘虫的触杀作用机理，发现其对神经系统和消化系统均有影响，靶标可能在乙酰胆碱能突触部位或 Na^+ 、 K^+ -ATP酶；(6)研制出雷公藤可湿性粉剂和雷公藤乳油2个制剂，对菜青虫、小菜蛾等害虫具有良好的防治效果；(7)申请并获得“雷公藤杀虫剂及其制造方法”国家发明专利(专利号：ZL00129820.8)，为产业化开发奠定了基础。鉴定委员会成员认真听取项目工作报告、技术报告，查阅了项目有关技术资料及查新报告，并通过现场考察、质疑和讨论后一致认为：该研究立项符合国际农药发展方向，研究方法和技术路线科学合理，技术资料齐全，数据翔实可靠，研究手段先进，试验工作扎实、细致；科研成果易与产业化相结合；该项研究在新化合物发现、雷公藤新碱及雷公藤甲素杀虫活性研究等方面属国内首创，总体研究达到国际领先水平。与会专家建议应继续深入探讨雷公藤活性物质的杀虫作用机理，加快成果转化，使其能尽早服务于农产品的安全生产。

(温晓平 供稿)