

山羊卵母细胞的显微受精^{*}

赵晓娥, 武 浩, 王勇胜, 刘凤军, 鲁 进, 张 涌

(西北农林科技大学 生物工程研究所, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 探讨了显微操作条件的改善对山羊卵母细胞胞质内显微受精(ICSI)的影响。结果表明,将精子操作液中聚乙烯吡咯烷酮(PVP)浓度从10% (10 g/L)降低到8%和5%后,ICSI胚的卵裂率差异不显著,但正常卵裂率、桑椹胚率和囊胚率随PVP浓度的下降而上升;PVP浓度为5%和10%时,正常卵裂率分别为69.6%和58.5% ($P < 0.05$),桑椹胚率分别为45.6%和35.2% ($P < 0.05$),囊胚率分别为26.9%和16.9% ($P < 0.05$),表明含5% PVP的精子操作液更有利于ICSI胚的发育。显微注射时将卵母细胞第一极体置于相当于时钟6点的位置与12点位置相比,ICSI胚的分裂率没有差异,而正常卵裂率分别为69.9%和65.4% ($P > 0.05$),桑椹胚率分别为45.5%和42.6% ($P > 0.05$),囊胚率分别为26.7%和20.4% ($P > 0.05$),表明注射时极体置于6点的位置有利于ICSI胚的体外发育。

[关键词] 卵母细胞;显微受精;聚乙烯吡咯烷酮;极体位置;囊胚率;山羊

[中图分类号] S827.3⁺4

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)04-0009-04

显微受精(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)是一项辅助体外受精技术,它是借助显微操作仪将精子注入卵母细胞质内,从而完成受精过程。它降低了对精子各种指标的要求,使各种在体内不可能发生正常受精的卵子受精,同时可以避免多精子受精,也为研究异种间受精提供了有效途径。近年来,精子胞质内显微注射技术在人、小鼠、兔、马、绵羊、牛、猪和猴上均已获得成功^[1]。但山羊体外受精技术还很不成熟,有关方面的研究报道也很少。本研究在山羊精子胞质内显微受精的基础上,研究了试验条件的改善对ICSI胚体外发育的影响。

1 材料与方法

1.1 屠宰卵巢的采集

卵巢采集于陕西省西安市屠宰场,大多为关中奶山羊卵巢。卵巢采集后置于20~30℃,含0.32 mg/mL硫酸庆大霉素生理盐水的保温瓶中,6~8 h内运回实验室。

1.2 卵巢卵母细胞的回收

用解剖法采集卵巢卵母细胞。将卵巢用含0.32 mg/mL硫酸庆大霉素的生理盐水洗净后,用外科手术剪剔除卵巢表面的结缔组织及附着的输卵管,再

用体积分数70%~75%酒精浸泡1 min,然后用生理盐水洗净,最后置于盛有D-PBS的培养皿中。在培养皿中用剃须刀或手术刀片切开卵巢表面1~5 mm的卵泡。切割完成后,将切割液置于体视显微镜下,收集培养皿中切出的卵丘-卵母细胞复合体(COCs)。

1.3 卵母细胞的成熟培养

将收集的A级和B级COCs在D-PBS中洗3次,然后在直径30 mm培养皿中(盛有500 μ L OM液)培养成熟。在38.5℃、体积分数5% CO₂和饱和湿度条件下成熟培养22~24 h。成熟培养液为H-M 199,即含10 mmol/L Hepes,0.38 mmol/L 丙酮酸钠,50 μ g/mL 硫酸庆大霉素,10% FBS (HyClone),5 mmol/L NaHCO₃,0.2 mmol/L 谷氨酰胺,10 ng/mL EGF和HMG(含0.075 U/mL FSH和LH)的TCM 199。然后在添加有0.1%透明质酸酶的培养液中除去卵母细胞周围的卵丘细胞。将具有第一极体的成熟卵母细胞移入含OM的微滴中,并覆盖石蜡油,即可备用。

1.4 精子的准备

采集奶山羊的精液,用含5%蛋黄的精子稀释液对精液做1:2~1:4倍稀释后,置于4℃冰箱中

^{*} [收稿日期] 2004-06-09

[基金项目] 国家“863”高科技项目(2001AA 213081)

[作者简介] 赵晓娥(1968-),女,陕西洋县人,助理研究员,在读博士,主要从事哺乳动物胚胎工程研究。E-mail: zhuxiao@sohu.com

[通讯作者] 张 涌(1956-),男,内蒙古和林格尔人,教授,博士,博士生导师,主要从事哺乳动物胚胎工程研究。

保存备用, 4 d 后弃去。用吸管吸取少量精液, 小心置于加有 1 mL 不含 BSA 的 BO 液的 EP 管底部, 悬浮 30 min 后, 活精子上游, 然后将上层液吸出少量, 添加在含不同浓度聚乙烯吡咯烷酮(PVP)的微滴液中, 即可备用。应注意的是, 精子要从精子操作液滴的底部边缘小心加入, 这样, 精子就不会悬浮在操作液滴的上层, 便于显微操作。

1.5 牛卵泡液(Bovine Follicular Fluid, BFF)的制备

用注射器吸取直径为 5~10 mm 卵泡的卵泡液, 将 5 个以上卵巢的卵泡液混匀, 4 000 r/min 离心 10 min, 吸上清液, 56 °C 水浴灭活 30 min, 0.22 μ m 过滤, 冻存备用。

1.6 颗粒细胞单层的制备

卵丘颗粒细胞来自成熟培养后的卵母细胞, 吹打均匀后以 H-M 199 悬浮, 四孔板中每孔含 500 μ L OM 液, 每孔接种颗粒细胞悬浮液 2~3 滴, 置 CO₂ 培养箱中, 在体积分数 5% CO₂、38.5 °C 和饱和湿度下培养, 颗粒细胞单层形成后备用。胚胎培养前 2 h, 在卵丘颗粒细胞单层上换入胚胎培养液(SOF_{aa})用于胚胎培养。

1.7 精子胞质内显微注射

在 Nikon 倒置显微操作仪下进行 ICSI 操作。精子注射管内径为 6~8 μ m, 固定管内径为 20~30 μ m, 均安装在显微操作仪上。在 60 mm × 15 mm 培养皿中, 自上而下做 3 个小滴, 上面小滴含精子, 中间小滴放置约 30~50 个待注射的卵母细胞, 下面小滴吹吸润洗注射管用。显微操作时, 首先将注射管移到下面小滴, 反复吹吸润洗后, 再将注射管移到上面小滴, 选择直线前进运动的精子, 在垂直于精子尾部中段处猛然划过, 使精子尾部打折以确定质膜破裂, 然后将单个精子从尾部吸入注射管开口端。微升注射管, 移动固定管和注射管到中间含卵母细胞的液滴中, 此时用固定管固定卵母细胞, 使卵母细胞的

第一极体朝液滴内相当于时针 12 点或 6 点的位置, 注射管在相当于 3 点的位置穿过透明带, 向着 9 点的方向深入, 先回吸少量细胞质, 确定卵质膜已破, 再将单个精子连同微量的 PVP 操作液注入卵胞质。随后, 轻轻撤出注射管, 并将卵母细胞从固定管释放。

1.8 注射后卵母细胞的激活

注射后卵母细胞在 CO₂ 培养箱中平衡 1 h 后, 用 D-PBS 液洗 3 遍, 移入含 5 μ mol/L 离子霉素(bonomycin)H-M 199 中激活 4 min, 然后再用胚胎培养液(SOF_{aa})洗 3 遍后, 移入 2 mmol/L 6-DMA P 中培养 3 h。

1.9 ICSI 胚的体外培养

ICSI 胚激活处理后, 先用胚胎培养液清洗 3 遍, 然后移入含 600 μ L SOF_{aa} 液的四孔板中, 并与颗粒细胞单层共培养。培养第 3 天加入体积分数 10% BFF, 培养 48 h 后观察卵裂率, 培养 5~9 d 时, 观察记录发育到桑囊胚阶段的胚胎数, 评定早期胚胎发育能力。

1.10 统计分析

所有试验重复 5 次以上, 用 χ^2 法对数据进行显著性检验。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 PVP 对 ICSI 胚体外发育的影响

含不同浓度 PVP 的精子操作液对 ICSI 胚体外发育的影响结果见表 1。从表 1 可以看出, 当精子操作液中 PVP 浓度从 10% 降低到 8% 和 5% 时, ICSI 胚的卵裂率差异不显著, 但正常卵裂率、桑椹胚率、囊胚率在提高, 5% 和 10% 的正常卵裂率(69.6% 和 58.5%)、桑椹胚率(45.6% 和 35.2%)、囊胚率(26.9% 和 16.9%) 差异显著($P < 0.05$)。可见, 含 5% PVP 的精子操作液更有利于 ICSI 胚的发育。

表 1 PVP 浓度对 ICSI 胚体外发育的影响

Table 1 Effect of concentrations of PVP on development of ICSI embryo in vitro

PVP 浓度/% Concentration of PVP	卵母细胞数 No. of oocytes	卵裂率/% Cleavage rate	正常卵裂率/% Regular cleavage rate	桑椹胚率/% Morulae rate	囊胚率/% Blastocyst rate
5	224	76.3(171/224) a	69.6(119/171) a	45.6(78/171) a	26.9(46/171) a
8	218	75.6(165/218) a	61.2(101/165) ab	38.8(64/165) ab	19.4(32/165) ab
10	189	75.1(142/189) a	58.5(83/142) b	35.2(50/142) b	16.9(23/142) b

注: 正常卵裂指 8 细胞以前卵裂球大小均一。相同字母差异不显著, 不同字母差异显著。下表同。

Note: Regular cleavage means the size of cleavage ball before 8-cell is equal

2 2 注射时极体位置对 ICSI 胚体外发育的影响

注射时极体位置对 ICSI 胚体外发育的影响结果见表 2。由表 2 结果可知, 显微注射时将极体置于相当于时钟 6 点或 12 点的位置, 二者间 ICSI 胚的卵裂率差异不显著, 而在 6 点时桑椹胚率(45. 5%)、

囊胚率(26. 7%) 较 12 点时桑椹胚率(42. 6%)、囊胚率(20. 4%) 有所提高, 但差异不显著($P > 0. 05$)。可见, 注射时极体置于 6 点的位置有利于 ICSI 胚的体外发育。

表 2 注射时极体位置对 ICSI 胚体外发育的影响

Table 2 Effect of location of polar body (PB) on ICSI embryo in vitro					
极体位置 Location of polar body	卵母细胞数 No. of oocytes	卵裂率/% Cleavage rate	正常卵裂率/% Regular cleavage rate	桑椹胚率/% Morulae rate	囊胚率/% Blastocyst rate
6 点 6 o'clock	232	75. 9(176/232) a	69. 9(123/176) a	45. 5(80/176) a	26. 7(47/176) a
12 点 12 o'clock	215	75. 3(162/215) a	65. 4(106/162) a	42. 6(69/162) a	20. 4(32/162) a

3 讨 论

3 1 PV P 对 ICSI 胚体外发育的影响

显微受精过程会使卵子受到不同程度的损伤, 特别是胞质内精子注射, 注射针管本身不仅能造成细胞膜和细胞骨架等细胞器的损伤, 而且精子注射还会带入一些生物污染物, 给卵子受精和发育带来不利影响。另外, 精子操作液中所含的 PV P 对卵母细胞也有一定影响。PV P 是一种大分子聚合物, 添加在精子操作液中可以使液体变得粘稠, 进而减缓精子的运动速度, 便于操作者捕捉精子, 还可以使精子在注射管中进退顺畅, 不至于粘在管壁上。PV P 作为精子操作液中的一种成分, 在注射时同精子一起被注入卵母细胞, 但是 PV P 并非是一种完全无活性的化学物质, 因此可能会影响 ICSI 的结果。有研究发现^[2], 经 PV P 预先作用后的精子注射入卵母细胞后, 可以使 Ca^{2+} 波动出现的时间延迟, 并且可能使精子质膜更加稳定, 从而阻碍精核解聚和卵子的激活。因此, PV P 的浓度要合适。许多研究者以前均广泛采用 10% PV P, 后来发现适当降低这一浓度不会给操作带来困难。Wei 等^[3]将 PV P 的浓度从 10% 降到 4% 和 0, 发现受精卵的发育率依次明显提高, 但是操作液中若不加 PV P, 显微操作会变得十分困难。因此, 本研究将 PV P 的浓度从 10% 降到 8% 和 5%, 比较其发育效果, 发现 3 组卵子分裂率差异不大, 正常卵裂率、桑椹胚率、囊胚率随 PV P 浓度的下降而上升。这可能是因为 PV P 的危害性随其浓度的降低而减小; 另一个原因可能是 PV P 粘稠性下降后, 可以更快地溶到卵胞质中, 使注射的精子与卵子更快地接触, 即促进了精卵互作的时机。因此, 在操作不受影响的情况下, 在精子操作液中添加 5% PV P 较适宜受精卵的发育。

3 2 注射时极体位置对 ICSI 胚体外发育的影响

显微注射受精过程中最重要的两个因素就是第一极体的位置和卵母细胞膜的穿破类型。有关卵母细胞在显微注射时不同破膜表现对受精和卵裂影响的研究, 国内外的结论都比较统一; 而有关第一极体位置与卵母细胞受精和卵裂的关系, 许多学者的结论并不完全一致。多项研究表明^[3~6], 90% 左右卵母细胞的纺锤体位于第一极体附近的位置, 故显微注射受精时多用第一极体作为卵母细胞纺锤体位置的定位参照, 对于 ICSI 中极体位置的研究, 实质上是对精子沉积位置和卵母细胞纺锤体位置相对关系的研究。许多研究者在进行兔、马、羊等动物的 ICSI 研究时, 习惯将极体固定在液滴内相当于时钟 12 点或 6 点的位置, 注射管从 3 点方向插入, 他们认为这两个位置对 ICSI 成功率的影响差异不显著^[4]。但在人的 ICSI 研究中, 关于 12 点和 6 点的位置有不同的观点。有研究认为^[5], 极体在 6 点比 12 点的位置受精率高、胚胎质量好。但 Stoddart 等^[6]认为, 极体在 6 点和 12 点对人 ICSI 的临床结果没有明显差异。A sch 等^[7]认为, 显微操作时, 注射针从 3 点的位置穿破卵母细胞膜, 针尖开口向下, 则注射针下方的胞浆及其显微结构更有可能因回吸引起丢失和破坏, 使卵母细胞易于退化, 进而影响受精和胚胎发育。据此, 极体位于 6 点时, 卵母细胞所受的损伤比较大。但是另一方面, 精子注入卵母细胞内后沉积的位置及其与纺锤体的距离也非常重要, 当精子注入卵母细胞内后, 距离纺锤体越近, 就有可能更好更早地激活卵母细胞, 使之受精; 距离越远, 则受精延迟, 胚胎的发育也相对缓慢, 因此极体位于 6 点时有较高的受精率, 也利于胚胎的早期发育^[5]。本研究比较了山羊卵母细胞的第一极体在 6 点和 12 点位置对 ICSI 胚发育效果的影响, 结果表明, 显微操作时极体在 6 点位置 ICSI 胚的正常卵裂率、桑椹胚率、囊胚率比

12 点位置有所提高,但差异不显著。这可能是因为在极体在 6 点时,当精子注入卵母细胞内之后,距离纺锤体越近,就有可能更好更早地激活卵母细胞,使之

受精。因此,本研究认为,卵子的极体固定在 6 点的位置较有利于 ICSI 卵的发育。

[参考文献]

- [1] Anagimachi R. Gamete manipulation for development new methods for conception[J]. Reprod Fertil Dev, 2001, 13(1): 3- 14
- [2] Ozortsev D, Rybouchkin A, De Sutter P, et al. Sperm plasma membrane damage prior to intracytoplasmic sperm injection: anecessary condition for sperm nuclear decondensation[J]. Hum Reprod, 1995, (11): 2960- 2964
- [3] Wei H, Yutaka Fukui. Technical improvement in intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in cattle[J]. Journal of Reproduction and Development, 2000, (46): 403- 407.
- [4] Westerlaken L A, Helmerhorst F M, Hemans J, et al. Intracytoplasmic sperm injection: position of the polar body affects pregnancy rate[J]. Hum Reprod, 1999, (10): 2565- 2569
- [5] 罗海宁, 刘 群, 朱桂金. 第一极体位置对卵母细胞显微注射受精后受精和胚胎发育的影响[J]. 潍坊医学院学报, 2002, 24(2): 91- 93
- [6] Stoddart N R, Fleming S D. Orientation of the first polar body of the oocyte at 6 or 12 o'clock during ICSI does not affect clinical outcome[J]. Hum Reprod, 2000, (7): 1580- 1585
- [7] Asch R, Simerly C, Ord, et al. The stages at which human fertilization arrests: microtubule and chromosome configurations in inseminated oocytes which failed to complete fertilization and development in humans[J]. Hum Reprod, 1995, 10: 1897- 1901.

Fertilization by intracytoplasmic sperm injection in goat oocytes

ZHAO Xiao-e, WU Hao, WANG Yong-sheng, LIU Feng-jun, LU Jin, ZHANG Yong

(Bioreengineering Institute, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: This study was conducted to investigate factors influencing ICSI in Goat. In experiment 1, three concentrations (10%, 8% and 5%) of polyvinylpyrrolidone (PVP) in the sperm injection vehicle solution were compared. There was no effect of the three PVP concentrations on cleavage rate after sperm injection, but regular cleavage rate, morulae rate and blastocyst rate were improved with decreasing concentration of PVP, cleavage rate (69.6% and 58.5%), morulae rate (45.6% and 35.2%) and blastocyst rate (26.9% and 16.9%) were significantly higher with 5% than 10% PVP ($P < 0.05$). 5% PVP in the sperm injection vehicle solution could improve the development of oocytes after ICSI. In experiment 2, two positions (6 and 12 o'clock) of the first polar body (PB) located in oocyte at ICSI were examined. There were no significant differences in the cleavage rate, regular cleavage rate (69.9% and 65.4%, $P > 0.05$), morulae rate (45.5% and 42.6%, $P > 0.05$), blastocyst rate (26.7% and 20.4%, $P > 0.05$) between the two positions of the PB, but they were improved at 6 o'clock of the polar body. Oocytes should be injected with the polar body at 6 o'clock.

Key words: oocytes; ICSI; PVP; positions of the first polar body (PB); blastocyst rate; goat