

猪卵巢重量与卵母细胞质量的相关性研究^{*}

黄德宝¹, 胡建宏¹, 李青旺^{1, 2a}, 冯 涛¹,

丁海荣¹, 杨智青¹, 董文素^{2b}

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100;

2 燕山大学 a 环境与化学工程学院, b 附属中学, 河北 秦皇岛 066004)

[摘 要] 将 132 个猪卵巢按重量分为 A、B 和 C 3 个级别, 用抽吸法结合切割法采集卵母细胞, 研究卵巢重量与 3 个级别卵母细胞质量的相关性。结果表明: 当卵巢重量 > 4 000 g 时, A 级卵母细胞的数量与卵巢重量呈负相关 ($r_A = -0.2770$); 当卵巢重量在 2 000~4 000 g 时, A 级卵母细胞的数量与卵巢重量呈正相关 ($r_A = 0.3827$), 且差异极显著 ($P < 0.01$), 无论单个卵巢获得的卵母细胞总数, 还是 A 级卵母细胞的比例, 均明显高于其他重量的卵巢; 当卵巢重量 $\leq 2 000$ g 时, A 级卵母细胞的数量与卵巢重量有一定的正相关性。研究结果表明, 在采集猪卵巢卵母细胞时, 建议采集重量在 2 000~4 000 g 的卵巢, 以获得较多数量的 A 级卵母细胞。

[关键词] 猪; 卵巢重量; 卵母细胞质量; 相关性

[中图分类号] S828.3⁺4

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)08-0012-04

哺乳动物卵巢内有几十万乃至上百万的卵母细胞, 其中绝大多数在生长发育过程中凋亡或因未被利用而退化。王海滨等^[1]研究指出, 猪出生时卵巢内的原始卵泡约有 40 万个卵母细胞, 但人们只能采集卵巢表面的少数卵母细胞, 而大多数卵母细胞未被利用。因此, 科学家不断的改进卵母细胞的收集方法, 以期利用更多的卵母细胞资源^[2]。

卵母细胞体外培养体系的建立充分利用了屠宰场废弃的卵巢资源, 为体外生产胚胎与核移植研究提供了充足的卵母细胞。自 Mattiolo^[3]用体外成熟的卵母细胞获得试管猪以来, 卵母细胞的体外成熟培养已经取得了较大进展^[4], 从屠宰场废弃猪卵巢中获取卵母细胞, 已成为体外受精、核移植、转基因等相关胚胎工程技术研究的主要材料来源之一^[5]。为获取更多的卵母细胞资源, 张涌等^[6]体外培养了山羊小腔卵泡卵母细胞; Abir 等^[7]首次对腔前卵泡进行了分离; 孟庆刚等^[8]对猪小腔卵泡卵母细胞进行了体外培养; 郭继彤等^[9]对卵泡卵母细胞的收集方法进行了初步研究。

在国外, 核移植猪等一系列研究均已取得了重大突破^[10~12]。由于猪的克隆和转基因技术在生物医学领域, 如异体器官移植方面具有广阔的应用前景,

使猪卵母细胞的需求量不断增加, 促使研究人员对猪卵巢卵母细胞的采集技术进行了深入研究。但在众多研究中, 人们只注重卵泡大小与卵母细胞质量和数量的关系, 而对简单快捷的通过卵巢重量预测卵母细胞数量的研究相对较少。因此, 探索猪卵巢重量与卵母细胞数量及质量的关系, 进一步提高卵母细胞的采集效率, 为胚胎工程技术准备更多优良的成熟卵母细胞日益受到研究者的广泛关注^[13, 14]。

本研究对猪卵巢重量与卵母细胞质量和数量的关系进行了初步研究, 以期通过卵巢重量估测卵母细胞的质量, 提高卵母细胞的采集效率, 为同类胚胎生物工程技术研究提供一定的参考和指导, 为胚胎工程技术提供更多优质的卵母细胞资源。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

仪 器 保温壶、电子分析天平、称量纸、游标卡尺、手术刀片、实体显微镜、捡胚吸管、恒温箱、灭菌吸水纸、超级洁净台。

试 剂 9 g/L 生理盐水, 体积分数 70% 酒精等。

^{*} [收稿日期] 2005-04-21

[基金项目] 河北省秦皇岛市科技局项目“利用转基因羊生产基因工程药物”部分内容(T83)

[作者简介] 黄德宝(1971-), 男, 陕西吴旗人, 助理研究员, 主要从事动物遗传与繁育研究。

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

1.2 卵巢的采集与清洗

本研究所用卵巢采自陕西杨凌西大寨屠宰场。待猪屠宰后, 立即将其卵巢剪下, 放入加有双抗的 35~ 38 ℃ 灭菌生理盐水中, 在 3 h 内带回实验室。然后用无菌剪刀剪除卵巢上的韧带、输卵管及附带的脂肪组织, 用体积分数 70% 酒精浸泡数秒后, 再置于 37 ℃、9 g/L 无菌生理盐水中冲洗 3 次。

1.3 卵巢的称重与测量

冲洗后的卵巢用灭菌吸水纸吸干水分, 用电子分析天平称重后, 迅速用游标卡尺测量卵巢的长、宽、厚, 然后立即转移至无菌操作间采集卵母细胞。

1.4 卵母细胞的采集

首先, 用抽吸法进行采集, 将卵巢置于灭菌纱布上, 用带有 12# 针头的一次性 5 mL 注射器吸取 1 mL 预热至 37 ℃ 的生理盐水, 再用其抽吸卵泡液, 将抽吸的卵泡液注入已预热至 37 ℃ 的灭菌培养皿内。其次, 用切割法将抽吸卵泡液后的卵巢纵横切割, 用 9 g/L 生理盐水冲洗卵巢和手术刀片, 收集冲洗液于灭菌培养皿中, 静置 15 min 后, 在实体显微镜下迅速检出卵母细胞。

1.5 卵母细胞的分级与数量统计

用于体外授精的卵母细胞要求有完整的卵丘细胞包裹, 细胞质均匀并充满透明带。根据卵母细胞的有无和数量, 猪卵母细胞一般可分为 3 级^[11]: A 级, 5 层卵丘细胞紧密包裹; B 级, 5 层以下卵丘细胞包裹, 卵丘完整, 无裸露的透明带; C 级, 裸卵, 有极少或无卵丘细胞包裹。根据此分级标准, 分别统计不同级别的卵母细胞数量。

1.6 数据处理

本研所得数据利用 EXCEL 软件进行统计学处理, 并进行 *t* 检验。

2 结果与分析

2.1 卵巢重量对卵母细胞数量的影响

由表 1 可知, 不同重量卵巢所采集的卵母细胞数量有较大差异, 以卵巢重量为 2 000~ 4 000 g 时得到的平均卵母细胞数最多, 与卵巢重量> 4 000 g 和≤2 000 g 相比, 差异极显著(*P*< 0.01)。因此, 为获得较多数量的卵母细胞, 应采集卵巢重量在 2 000~ 4 000 g 的卵巢。

表 1 卵巢重量对卵母细胞数量的影响

Table 1 Effect of the weight of the ovary on the quantity of oocytes

卵巢重量/g Ovary mass range	卵母细胞数 No. of oocytes	卵巢数 No. of ovaries	平均卵母细胞数 No. of every ovary
> 4 000	118	6	19.83 A
2 000~ 4 000	2 524	86	29.30 B
≤2 000	652	40	13.75 C

注: 同列数据后标注不同大写字母者表示差异极显著(*P*< 0.01)。
Note: Table with different letters show s obversely difference (*P*< 0.01).

2.2 卵巢重量对卵母细胞等级的影响

将 132 个卵巢按卵巢重量> 4 000 g, 2 000~ 4 000 g 和≤2 000 g 分成 3 个组, 分别计数各组中 A、B、C 级卵母细胞的数量, 结果见表 2。

从表 2 可以看出, 卵巢重量在 2 000~ 4 000 g 时, A 级和 B 级卵母细胞比例显著高于其他 2 组, 而 C 级卵母细胞比例显著低于其他 2 组。

表 2 猪卵巢重量对卵母细胞等级的影响

Table 2 Effect of ovary weight on oocytes level

卵巢重量/g Ovary weight	卵母细胞数 No. of oocytes	占卵母细胞数的百分比/% Percentage of number of oocytes		
		A	B	C
> 4 000	118	19.49(23) b	30.51(36) b	50.00(59) b
2 000~ 4 000	2 524	24.96(630) a	34.83(879) a	40.21(1 015) a
≤2 000	652	20.55(134) b	30.83(201) b	48.62(317) b

注: 同列数据后标注不同小写字母者表示差异显著(*P*< 0.05)。
Note: Table with different letters show s significant difference (*P*< 0.05).

2.3 卵巢重量与卵母细胞等级的相关性分析

通过统计分析可知, 卵巢重量与卵母细胞等级

具有一定的相关性, 其相关系数见表 3。

表 3 卵巢重量与卵母细胞等级的相关性

Table 3 The relation between the weight of the ovary and the grade of the oocytes

卵巢重量/g Ovary weight	卵巢数 No. of ovaries	平均卵巢重量/g Average weight of ovary	相关系数 Related coefficient
> 4 000	6	4 471 0	$r_A = -0.2770$
			$r_B = 0.4976$
			$r_C = 0.3631$
2 000~4 000	86	2 788.9	$r_A = 0.3827$
			$r_B = 0.2991$
			$r_C = 0.4355$
≤2 000	40	1 617.8	$r_A = 0.0630$
			$r_B = 0.1914$
			$r_C = -0.1008$

由表 3 可知,当卵巢重量> 4 000 g 时,卵巢重量与 A 级卵母细胞呈较强的负相关,但差异不显著($P_A > 0.05$),而与 B 级和 C 级卵母细胞呈较强的正相关,且差异显著($P < 0.05$);当卵巢重量为 2 000~4 000 g 时,卵巢重量与不同组别的卵母细

胞之间均有较强的正相关性,且差异极显著($P < 0.01$),但与 A 级和 C 级卵母细胞的相关性明显优于 B 级卵母细胞;当卵巢重量≤2 000 g 时,卵巢重量与 A、B 级卵母细胞之间具有一定的正相关,而与 C 级卵母细胞呈弱的负相关。

2.4 卵巢重量与卵母细胞数的关系分布图

为了更直观地分析不同重量卵巢与卵母细胞数量的关系,将卵巢重量按 0.25 g 的级别进行细分,利用分析软件分别绘制卵母细胞数和 A 级卵母细胞数与不同重量卵巢的直方图,结果见图 1 和图 2。

图 1 结果表明,卵母细胞数与卵巢重量间呈近似的正态分布,当卵巢重量在 2 000~4 000 g 时,卵母细胞数明显多于其他重量卵巢的卵母细胞数。

从图 2 可以看出,卵巢重量在 2 000~4 000 g 时,A 级卵母细胞数明显多于卵巢重量> 4 000 g 或≤2 000 g 时所采集的 A 级卵母细胞数。

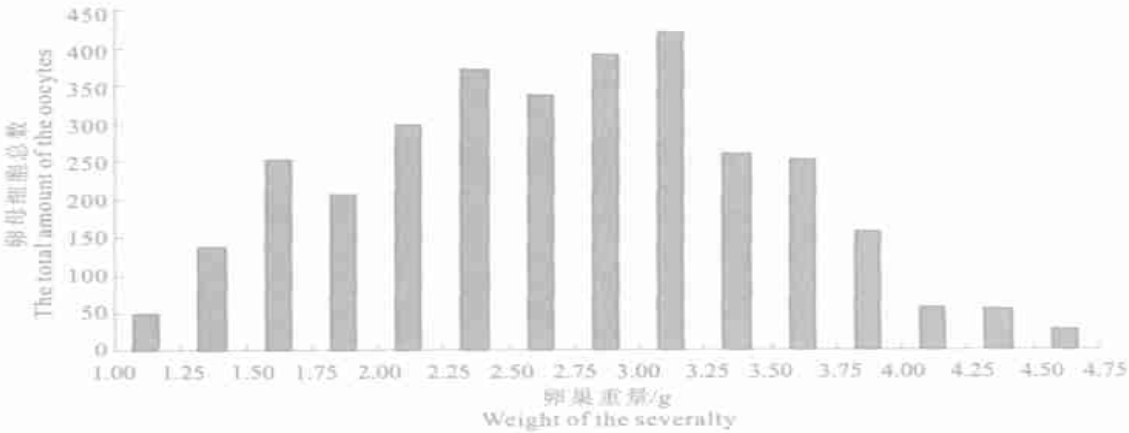


图 1 卵巢重量与卵母细胞数的分布直方图

Fig 1 The relation graph between ovary weight and the quantity of oocytes

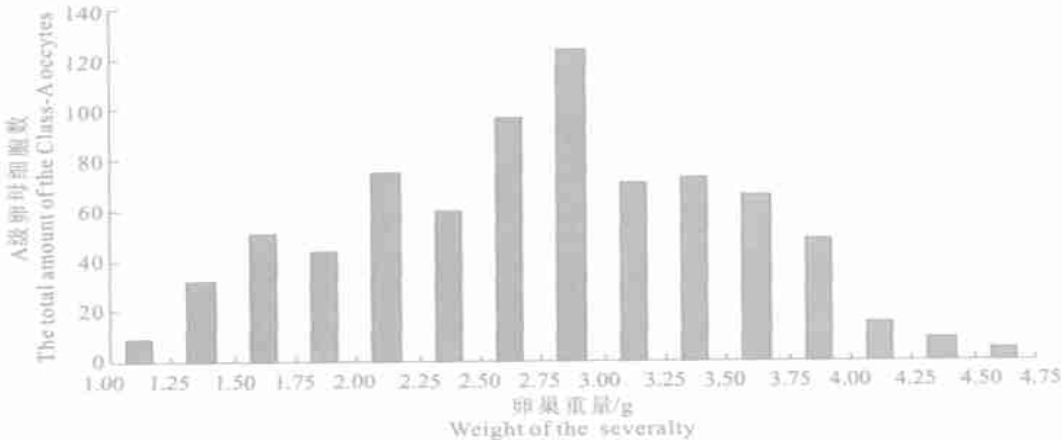


图 2 卵巢重量与 A 级卵母细胞数的分布直方图

Fig 2 The relation graph between ovary weight and the quantity of Class-A oocytes

3 结论与讨论

3.1 卵巢重量与卵母细胞质量的相关性

卵巢的大小与重量直接影响卵母细胞的数量和质量,大小不同的卵巢都可以获得卵母细胞,但不同重量等级的卵巢所获得的卵母细胞数量相差很大^[15]。本研究结果表明,卵巢重量在2 000~4 000 g时,其卵母细胞无论是数量还是质量,均显著优于其他重量的卵巢;对于重量较大(卵巢重量>4 000 g)的卵巢,其表面存在大液泡,但获得的卵母细胞数量极少;对于重量较小(卵巢重量≤2 000 g)的卵巢,所采集的卵母细胞中A级卵母细胞所占比例较小(20.55%),C级卵母细胞所占比例较大(48.62%)。因此,采集卵母细胞时,以卵巢重量2 000~4 000 g为宜,可得到数量较多和质量较好的卵母细胞。在本试验中,从重量>4 000 g的卵巢所获得的卵母细胞数量较少,质量也较差,但因所选的样本数量较少(只有6个),故对重量>4 000 g的卵巢与卵母细胞数量和质量的的关系,还有待于进一步研究。

3.2 卵母细胞的采集技术

卵母细胞的收集方法主要有抽吸法和切割法。抽吸法简便、快速,是目前最常用的采卵方法,但卵

母细胞回收率不高,且容易破坏卵丘细胞的整体结构而出现卵丘不完整的卵丘-卵母细胞复合体(Cumulus oocyte complex, COCs)和裸卵;切割法程序复杂、费时,但回收率高,能获得更多的卵母细胞。Mogas等^[13]和Pawsh等^[14]曾对切割法收集卵母细胞的优势进行过类似的报道。本研究将2种方法结合使用,取长补短,以便获得更多的卵母细胞。

在采集卵母细胞时,捡卵时间直接影响卵母细胞的存活率。如果捡卵时间持续2~3 h,则卵母细胞的存活率明显降低,同时显微镜光源温度升高对培养皿不断加热,造成温度过高,也会导致卵母细胞崩解。因此,捡卵时应熟练掌握收集技术,尽量缩短捡卵时间,同时采用冷光源。

3.3 卵巢的运输方式

一般情况下,卵巢的运输时间以2 h内为最佳,不能超过6 h。李华威等^[16]研究认为,卵巢的运输温度以25~30℃为宜;姜国成等^[17]研究报道,猪卵母细胞在20℃室温下保存24 h对成活率和后继发育能力无明显影响。因此,猪卵巢的运输温度以室温为宜,运输时间以2~4 h为佳。另外,屠宰场卫生条件要好,避免卵巢采集时将猪体表的附属物、泥土等混入影响卵巢活性。

[参考文献]

- [1] 王海滨,夏国良,李美玲,等.哺乳动物卵母细胞体外培养体系的研究进展[J].农业生物技术学报,2000,8(3):297-310
- [2] 施旭东,孙贝加,陈华,等.人腔前卵泡体外培养研究[J].中国优生与遗传杂志,2001,9(2):5-7
- [3] Mattiolo. Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized *in vitro* [J]. Theriogenology, 1989, 31(6): 1201-1207
- [4] 秦鹏春,谭景和,吴光明.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
- [5] 陈大元.受精生物学——受精机制与生殖工程[M].北京:科学出版社,2000:318
- [6] 张涌,刘素娟,李勇,等.山羊小腔卵母细胞的体外成熟培养和体外受精[J].西北农业大学学报,1996,24(4):12-16
- [7] Abir R, Moor P A, Franks S, et al. Mechanical isolation and *in vitro* growth of preantral and small antral human follicles [J]. Fertil Steril, 1997, 68(4): 682
- [8] 孟庆刚,张成林,张永忠,等.猪小腔卵泡卵母细胞体外成熟培养[J].畜牧兽医学报,2001,32(3):213-219
- [9] 郭继彤.成年细胞克隆山羊的研究[D].陕西杨凌:西北农林科技大学,2000:65-72
- [10] Akira Onishi, Masaki Lwamoto, Tomiji Akita, et al. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei [J]. Science, 2000, 18: 117-119
- [11] Irina A, Polejaeva, Chen Shu-hong, et al. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic Nuclei [J]. Nature, 2000, 407(7): 86-90
- [12] Lai Liang-xue. Production of α -1, 3 galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning [J]. Science, 2002, 295(8): 1089-1092
- [13] Mogas T, Martino M. Effect of method of recovery on the number and type of oocytes obtained for IVF [J]. J Reprod Fertil, 1998, 9: 53
- [14] Pawsh C H, Totey S M, Jain S K. A comparison of three methods of recovery of goat oocytes for *in vitro* maturation and fertilization [J]. Theriogenology, 1994, 42: 117-125
- [15] 高志花,周虚,高庆华.卵巢大小及发育状况与牛腔前卵泡采集数量的关系[J].中国兽医学报,2004,24(1):84-86
- [16] 李华威,朱淑文,华修国,等.卵巢运输温度对猪卵母细胞体外受精和发育的影响[J].中国兽医学报,2004,24(6):617-618
- [17] 姜国成,秦鹏春.猪卵母细胞的室温保存[J].畜牧兽医学报,1992,23(4):295-298

(下转第20页)

oocytes derived from abattoir ovaries following *in vitro* maturation, fertilization and culture. In experiment 1, BFF of (10%, 20%, and 40%) different concentrations from all follicles ($> 2\text{ mm}$) were supplemented to the maturation medium. The results show that different concentration's of BFF could support *in vitro* maturation of COCs and subsequent development capacity, however, 20% and 40% BFF could seriously cause oocytes and embryos to adhere together. Therefore, adding 10% of mixing BFF in maturation medium could be the best choice. Experiment 2 shows that the presence of granulosa cells during maturation and culture did not affect the cleavage rate, 6-8 cells rate and blastocyst rates ($P > 0.05$) of oocytes in grade 1. However, the cleavage rate, 6-8 cells rate and blastocyst rates in grade 2 and grade 3 were higher ($P < 0.05$) when COCs were cultured in the presence of GCM than when cultured in the absence of GCM. In experiment 3, about 20 oocytes derived from every cow were cultured and fertilized in different sizes of medium drops (30, 50, 100 and $200\text{ }\mu\text{L}$). The blastocyst developmental rates of 30 and $50\text{ }\mu\text{L}$ groups were higher than 100 and $200\text{ }\mu\text{L}$ treatments ($P < 0.05$).

Key words: bovine; oocyte; culture system; *in vitro* fertilization; embryonic development

(上接第 15 页)

Abstract ID: 1671-9387(2005)08-0012-EA

The research on the relation between weight of ovary and quantity of the porcine oocytes

HUANG De-bao¹, HU Jian-hong¹, LI Qing-wang^{1, 2a},
FENG Tao¹, DING Hai-rong¹, YANG Zhi-qing¹, DONG Wen-su^{2b}

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 a College of Environment and Chemistry Engineering, b The Affiliated Middle School, Yanshan University, Qinhuangdao, Hebei 066004, China)

Abstract: Aspiration and dissection were used to dispose 132 collected pig ovaries in this paper. The ovaries were divided into three classes ($m \leq 2\text{ }000\text{ g}$, $2\text{ }000\text{ g} < m < 4\text{ }000\text{ g}$, $m > 4\text{ }000\text{ g}$) according to the weight (m) and the quantity of oocytes. Then the data were analysed. The result demonstrated, at $m > 4\text{ }000\text{ g}$, the quantity of A-class oocytes and ovary weight had a negative correlation ($r_A = -0.277\text{ }0$); $2\text{ }000\text{ }-4\text{ }000\text{ g}$, the quantity of A-class oocytes and ovary weight had a positive correlation obviously, $r_A = 0.382\text{ }7$ ($P < 0.01$). In the weight range, the average of the oocytes from each ovary or the percent of the Class-A were more than other weight ranges; at $m \leq 2\text{ }000\text{ g}$, the quantity of A-class oocytes and ovary weight had a positive correlation. Ovaries with the weight of $2\text{ }000\text{ g} < m < 4\text{ }000\text{ g}$ should be collected, so that more Class-A oocytes can be obtained.

Key words: porcine; weight of the ovary; quantity of oocytes; relation