

猪卵母细胞第一极体排出与否 对其早期胚胎发育的影响^①

兰宗宝^{1,2}, 何若钢², 莫品方^{1,2}, 卢晟盛^{1,2},
潘天彪³, 蓝海恩³, 黄敏瑞³, 卢克焕^{1,2}

1. 广西大学 广西亚热带生物资源保护利用重点实验室, 南宁 530004;
2. 广西大学 动物科学技术学院, 南宁 530004; 3. 广西畜牧研究所, 南宁 530001

摘要: 探讨猪卵母细胞第一极体排出与否对其体外受精和孤雌激活后早期发育的影响. 从屠宰场收集猪卵巢卵母细胞, 体外成熟培养 42~46 h 后分为 3 组: 排出第一极体组、没有排出第一极体组和对照组(不挑选第一极体卵母细胞), 进行体外受精或化学孤雌激活之后放入胚胎培养液进行体外培养, 分别于第 48 h 和第 168 h 统计分裂率和囊胚率. ① 体外受精后, 有极体组的卵裂率略高于无极体组和对照组的卵裂率($62.19\% \pm 6.99\%$ vs $55.40\% \pm 6.80\%$ 和 $56.33\% \pm 8.17\%$), 各组间没有显著差异($p > 0.05$); 囊胚率分别为 $4.87\% \pm 3.77\%$, $2.33\% \pm 1.34\%$ 和 $3.50\% \pm 2.96\%$, 有极体组明显高于无极体组($p < 0.05$), 对照组与其它两组没有显著差异($p > 0.05$). ② 化学激活后, 有极体组的卵裂率高于无极体组和对照组($75.45\% \pm 1.35\%$ vs $64.81\% \pm 2.07\%$ 和 $69.64\% \pm 2.51\%$, $p < 0.05$); 有极体组的囊胚率也高于无极体组和对照组($24.54\% \pm 4.34\%$ vs $12.96\% \pm 3.99\%$ 和 $18.75\% \pm 1.87\%$, $p < 0.05$). 排出第一极体卵母细胞比没有排出第一极体卵母细胞的发育能力强, 但没有排出第一极体卵母细胞经体外受精或人工激活后也可以发育到囊胚阶段.

关键词: 猪; 卵母细胞; 极体; 体外受精; 孤雌激活; 胚胎培养

中图分类号: S828

文献标识码: A

许多研究者^[1-3]把第一极体的排出作为卵母细胞核成熟的标志, 并认为只有成熟的卵母细胞才能够受精并发育至囊胚阶段. 也有假说认为^[4], 只有核成熟的卵母细胞(排出第一极体)才可能被乙醇及钙离子载体等诱导的钙离子信号增加所激活. 另有研究者^[5-6]发现, 没有排出第一极体的小鼠卵母细胞可以受精, 或孤雌激活后也可以发育至囊胚. 猪卵母细胞体外成熟 42~46 h 后, 有许多卵母细胞没有排出第一极体, 它们除了无极体外, 与排出极体的卵母细胞在形态上相比看不出差异. 目前, 还未见有关猪无极体卵母细胞体外受精或孤雌发育的报道. 本研究探讨了经过 40~44 h 体外成熟培养后排出第一极体和无极体的猪卵母细胞经过体外受精或孤雌激活后的早期发育能力.

1 材料和方法

1.1 试验材料

猪卵母细胞成熟液为改良 TCM-199 液, 胚胎培养液为 NCSU-23, 受精液为改良 Tris 缓冲液(mT-

① 收稿日期: 2007-10-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30660127); 广西科学基金资助项目(桂科青 0640002 和 0447004).

作者简介: 兰宗宝(1981-), 男, 广西龙胜人, 硕士研究生, 主要从事动物胚胎生物技术研究.

通讯作者: 卢克焕, 教授, 博士生导师.

BM),洗卵液为改良 TL-Hepes-PVA液,洗精子液为 Dulbecco's 磷酸缓冲液(DPBS).

TCM-199 粉剂购自美国 Gibco 生物化学公司,按说明配制成液体状态.其余化学药品均购自美国 Sigma 生物化学公司.配制培养液用水为本地自来水经过 2 次蒸馏,经 Mili-Q 器去离子,最后经石英蒸馏器蒸馏的超纯水.

1.2 试验方法

1.2.1 猪卵母细胞的采集和体外成熟培养

猪卵巢运回实验室后,剪除卵巢表面的结缔组织、脂肪等,用含有双抗(青霉素、链霉素)的生理盐水洗 3 遍.用带 12 号针头的 10 mL 一次性注射器抽取卵巢表面直径为 2~6 mm 的卵泡,在实体显微镜下用玻璃吸管挑选带有 2 层卵丘细胞以上的、胞质均匀的卵母细胞,在洗卵液中洗 3~5 遍,然后用事先平衡 6 h 以上的成熟液洗 2 遍,最后放入加有 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 促性腺激素(FSH、LH)及 10%猪卵泡液的成熟液中培养.培养箱的参数为:5% CO_2 、最大饱和湿度、39 $^{\circ}\text{C}$.

1.2.2 卵母细胞的准备

猪卵母细胞经过 40~44 h 的体外成熟培养后,放入含有 0.1%透明质酸酶的洗卵液中,在实体显微镜下,用移液枪反复吹打以除去卵丘细胞,然后在显微镜下观察卵母细胞的成熟情况,以排出第一极体作为卵母细胞核成熟的标志,并用玻璃吸管挑选出已排出第一极体且胞质均匀的核成熟卵母细胞用于授精,并放入事先平衡 6 h 以上的受精液中,每 30~35 枚细胞为 1 组.

1.2.3 精子的准备

猪新鲜精液由广西畜牧研究所提供,用洗精子液 1:5 稀释混匀后,1 500 r/min,离心 5 min,弃上清液,重复 3 次.离心 3 次后向沉淀物中加入 1 mL 的受精液,混匀并用精子计数器计算精子的密度,最后将精子稀释到所需要的浓度,放入 CO_2 培养箱中获能,待用授精.

1.2.4 卵母细胞的体外受精

将稀释好、获能后的处理精液以等体积(50 μL)比例加入到放有核成熟卵母细胞的受精液中,授精后将受精液放回 CO_2 培养箱中,让精卵共同孵育 6 h,然后将假定受精的卵母细胞从受精液中移出,在洗卵液用移液枪将透明带上多余的精子尽量吹打掉,再用 NCSU-23 培养液洗 2 遍后,移入 NCSU-23 培养液中(100 μL)继续培养,分别于 48 h 观察分裂情况,168 h 观察桑椹胚和囊胚.

1.2.5 卵母细胞的孤雌激活

将成熟好的卵母细胞用 5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 离子霉素处理 5 min 后,再用 2.5 mmol/L 6-二甲基嘌呤(6-DMAP)处理 4 h 之后用胚胎培养液 NCSU 洗涤 2 次,最后转移到 NCSU-23 培养液中(30 μL)继续培养,分别于 48 h 观察分裂情况,168 h 观察囊胚率.

2 试验设计

2.1 猪卵母细胞排出第一极体与否对体外受精后早期发育的影响

试验分 3 组:对照组为不经过挑选的卵母细胞,包括有极体的和无极体的卵母细胞,外观形态完整,胞质均匀;处理组 1 为排出第一极体的卵母细胞;处理组 2 为没有排出第一极体的卵母细胞.然后以 1×10^6 个/mL 精子的最终浓度加入含卵母细胞的 mTBM 中受精,共孵育 6 h 后将假设受精卵移入 NCSU-23 液中继续培养观察.

2.2 猪卵母细胞有极体与否对孤雌激活后早期胚胎发育的影响

体外成熟培养后的卵母细胞同 2.1 分组,各组卵母细胞分别采用 5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 离子霉素(Ionomycin)处理 5 min 后,再用 2.5 mmol/L 6-二甲基嘌呤(6-DMAP)处理 4 h,然后将假设激活卵移入 NCSU-23 液中继续培养观察.

3 结果与分析

试验数据先进行反正弦转换,再用 SAS 软件中的单因素方差分析(One-Way ANOVA)下的 Duncan's

多重比较检验各试验组之间的差异显著性. 概率 p 值小于 0.05 在统计学上被认为是差异显著.

3.1 猪卵母细胞排出第一极体与否对体外受精后早期发育的影响

试验重复了 13 次. 如表 1 所示, 试验挑选有无第一极体猪卵母细胞在体外受精后的卵裂率分别为 $62.19\% \pm 6.99\%$, $55.40\% \pm 6.80\%$ 和 $56.33\% \pm 8.17\%$, 3 组之间均无显著差异 ($p > 0.05$); 168 h 囊胚率分别为 $4.87\% \pm 3.77\%$, $2.33\% \pm 1.34\%$ 和 $3.50\% \pm 2.96\%$, 有极体组的囊胚形成率显著高于无极体组 ($p < 0.05$), 而对照组与其它 2 组之间均无显著差异 ($p > 0.05$). 结果说明了猪卵母细胞体外成熟培养后是否排出第一极体对体外受精后的早期胚胎发育有显著影响, 但没有排出第一极体的猪卵母细胞在体外受精后也能分裂和形成囊胚.

表 1 猪卵母细胞排出第一极体与否对体外受精后早期发育的影响

| 组别 | 卵母细胞数 | 分裂数(百分比/%) | 囊胚数(百分比/%) |
|------|-------|------------------------------|-----------------------------|
| 有极体组 | 677 | 421(62.19±6.99) ^a | 33(4.87±3.77) ^a |
| 无极体组 | 731 | 405(55.40±8.17) ^a | 17(2.33±1.34) ^b |
| 对照组 | 742 | 418(56.33±6.80) ^a | 26(3.50±2.96) ^{ab} |

注: a, b 表示差异显著 ($p < 0.05$).

3.2 猪卵母细胞排出第一极体与否对孤雌激活后早期发育的影响

试验重复了 6 次. 如表 2 所示, 猪卵母细胞经化学激活后, 排出第一极体组的卵裂率高于没有排出第一极体组和对照组 ($75.45\% \pm 1.35\%$ vs $64.81\% \pm 2.07\%$ 和 $69.64\% \pm 2.51\%$, $p < 0.05$); 有极体组的囊胚率也高于无极体组和对照组 ($24.54\% \pm 4.34\%$ vs $12.96\% \pm 3.99\%$, $18.75\% \pm 1.87\%$, $p < 0.05$); 无极体组和对照组的卵裂率之间及囊胚率之间均没有显著差异 ($p > 0.05$). 结果说明了猪卵母细胞体外成熟培养后是否排出第一极体对孤雌激活后的早期发育有显著影响, 但没有排出第一极体的猪卵母细胞经化学激活后也能分裂和形成囊胚.

表 2 猪卵母细胞排出第一极体与否对孤雌激活后的早期发育的影响

| 组别 | 卵母细胞数 | 分裂数(百分比/%) | 囊胚数(百分比/%) |
|------|-------|-----------------------------|-----------------------------|
| 有极体组 | 110 | 83(75.45±1.35) ^a | 27(24.54±4.34) ^a |
| 无极体组 | 108 | 70(64.81±2.07) ^b | 14(12.96±3.99) ^b |
| 对照组 | 112 | 78(69.64±2.51) ^b | 21(18.75±1.87) ^b |

注: a, b 表示差异显著 ($p < 0.05$).

4 讨 论

许多学者^[1-3]把第一极体的排出作为卵母细胞体外成熟的标志, 并认为只有成熟的卵母细胞才能够受精并发育至囊胚. 本研究表明: 经过体外成熟培养后部分没有排出第一极体的猪卵母细胞经体外受精后可以卵裂和形成囊胚, 结果与上述说法不一致, Eppig^[5]、McConnell^[6]也证实了小鼠无极体卵母细胞在体外可以被精子穿透并可发育至囊胚. 有学者发现部分没有排出第一极体卵母细胞能够受精并发育到囊胚, 但多数为三倍体^[5], 可能是因为这些无极体卵母细胞质已经成熟, 而胞质成熟并不依赖于核成熟(排出第一极体)^[6]. Crozet 等^[7]认为, 在体外, 细胞核成熟和质成熟并不是同时完成的, 完成了细胞核成熟的小腔卵泡卵母细胞即使发育到 MII 期并排出第一极体, 很少能够受精并发育到囊胚; 而大腔卵泡卵母细胞即使没有排出第一极体, 多数仍然能够受精. 据 McConnell 等^[6]报道, 小鼠核成熟卵母细胞经体外受精后, 体外发育明显好于核未成熟卵母细胞. 在本研究中, 猪排出第一极体卵母细胞经体外受精后的囊胚形成率显著高于没有排出第一极体卵母细胞 ($4.87\% \pm 3.77\%$ vs $2.33\% \pm 1.34\%$, $p < 0.05$). 造成这种差异的原因在于排出第一极体的卵母细胞处于 MII 期, 核成熟较好; 而经过 44~48 h 体外成熟培养后没有排出第一极体的卵母细胞, 尽管后来获取了部分营养物质, 排出第一极体, 但细胞质可能已经老化, 不利于早期胚胎发育^[8], 可能错过了成熟的最佳时间. 另外也有文献报道, 排出第一极体及第一极体的形态与卵母细胞本身的质量、受精率、卵裂率、囊胚形成率等具有相关性^[9]. Niwa^[10]认为, 在猪上引起多精入卵的重要原因之

一就是卵母细胞没有完全成熟,不能发生完善的皮质反应和透明带反应.本试验中对照组的卵母细胞与有极体组的卵母细胞经体外受精后,卵裂率之间和囊胚率之间均无显著差异,这可能是因为影响猪卵母细胞体外受精成功的因素是多方面的,如猪卵母细胞质的成熟度.卵母细胞第一极体的排出只说明卵母细胞核成熟,而不能反应卵母细胞质的成熟度,因为除了核成熟外,还包括卵母细胞质和透明带及细胞膜的成熟^[11].

有假说认为^[4],只有核成熟的卵母细胞才可能被乙醇及钙离子载体等诱导的钙离子信号增加所激活.本研究表明:没有排出第一极体的猪卵母细胞经离子霉素(5 min)+6-DMAP(4 h)联合激活后也可以形成卵裂和囊胚,结果与上述说法不一致,部分没有排出第一极体的卵母细胞也能够发育到囊胚,可能是因为它还处于GV到MII期的某一阶段,没有真正成熟^[9],经化学激活后才排出第一极体;到达MII期,进一步激活发育,有些始终未排出第一极体的卵母细胞经激活形成多核型的孤雌胚.据Mizutani等^[12]报道,大鼠核成熟卵母细胞经电激活后体外发育明显好于核未成熟卵母细胞.本研究也表明:猪排出第一极体卵母细胞经化学激活后的卵裂率及囊胚形成率显著高于没有排出第一极体卵母细胞.据陈大元^[2]、郭志勤等^[1]报道,孤雌生殖胚具有多种核型(有第一极体的单倍体和无极体的二倍体或多倍体),根据以上实验结果可以推测,卵母细胞成熟程度的不同是其产生的原因之一.从本研究看出,排出第一极体的卵母细胞化学激活后的卵裂率和囊胚率都高于对照组,这与Mizutani^[12]所报道的试验结果相一致.第一极体的排出标志着卵母细胞已经进入到MII期,而孤雌激活是通过某些方法诱导细胞内钙离子浓度的升高,使卵母细胞从MII期停止而进入分裂间期.

在本研究条件下,排出第一极体卵母细胞比没有排出极体卵母细胞的发育能力强,但没有排出第一极体卵母细胞经体外受精或孤雌激活后同样可以发育到囊胚阶段.

参考文献:

- [1] 郭志勤. 家畜胚胎工程 [M]. 北京: 中国科技出版社, 1998.
- [2] 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.
- [3] 罗光彬, 金花子, 郑英彩, 等. 体外成熟培养 20~22 h 牛卵母细胞激活及孤雌发育的研究 [J]. 中国畜牧杂志, 2004, 3: 10-12.
- [4] Sengoku K, Takuma N, Miyamoto T, et al. Nuclear Dynamics of Parthenogenesis of Human Oocytes: Effect of Oocyte Aging in Vitro [J]. Gynecologic and Obstetric Investigation, 2004, 58(3): 155-159.
- [5] Eppig J J, Wigglesworth K. A Typical Maturation of Oocytes of Strain I/LnJ Mice [J]. Human Reproduction, 1994, 9(6): 1136-1142.
- [6] McConnell J M, Campbell L, Vincent C. Capacity of Mouse Oocytes to Become Activated Depends on Completion of Cytoplasmic But Not Nuclear Meiotic Maturation [J]. Zygote, 1995, 3(1): 45-55.
- [7] Crozet N, Ahmed-Ali M, Dubos M P. Developmental Competence of Goat Oocytes From Follicles of Different Size Categories Following Maturation, Fertilization and Culture in Vitro [J]. Journal of Reproduction and Fertility, 1995, 103(2): 293-298.
- [8] 岳奎忠, 伊亚玲, 孙兴参. 卵母细胞成熟前发泡异(GV)质性的研究进展 [J]. 黑龙江动物繁殖, 2002, 2: 42-43.
- [9] Ebner T, Yaman C, Moser M, et al. Prognostic Value of First Polar Body Morphology on Fertilization Rate and Embryo Quality in Intracytoplasmic Sperm Injection [J]. Human Reproduction, 2000, 15(2): 427-430.
- [10] Niwa K. Effectiveness of in Vitro Maturation and in Vitro Fertilization Techniques in Pigs [J]. Journal of Reproduction and Fertility, 1993, 48: 49-59.
- [11] 周佳勃. 山羊体外受精和显微受精及相关问题的研究 [D]. 沈阳: 东北农业大学, 2003.
- [12] Mizutani E, Jiang J Y, Mizuno S, et al. Determination of Optimal Conditions for Parthenogenetic Activation and Subsequent Development of Rat Oocytes in Vitro [J]. The Journal of Reproduction and Development, 2004, 50(1): 139-146.

In Vitro Development of Porcine Oocytes with or without the First Polar Body after *in Vitro* Fertilization or Parthenogenetic Activation

LAN Zong-bao^{1,2}, HE Ruo-gang², MO Pin-fang^{1,2}, LU Sheng-sheng^{1,2},
PAN Tian-biao³, LAN Hai-en³, HUANG Min-rui³, LU Ke-huan^{1,2}

1. Guangxi Key Laboratory of Subtropical Bio-resources Conservation and Utilization, Guangxi University, Nanning 530004, China;

2. College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China;

3. Guangxi Institute of Animal Husbandry, Nanning 530001, China

Abstract: The developmental potential of porcine oocytes with or without the first polar body after *in vitro* inseminated or chemically activated was investigated. Porcine oocytes matured *in vitro* for 42–46 h were randomly divided into three groups: excluding the first polar body group, without the first polar body group and the control group. Porcine oocytes were inseminated *in vitro* using boar fresh spermatozoa or activated chemically, and then cultured *in vitro* for seven days. Cleavage and blastocyst rates were examined at 48h and 168h respectively. ① For those oocytes inseminated *in vitro*, no significant differences were observed on the cleavage rate among three groups ($62.19\% \pm 6.99\%$, $55.40\% \pm 6.80\%$ and $56.33\% \pm 8.17\%$, $p > 0.05$), while the blastocyst rate of the first polar body group ($4.87\% \pm 3.77\%$) was higher than ($p < 0.05$) that of without polar body group ($2.33\% \pm 1.34\%$), and no significant difference was observed on the blastocyst rate between the control group ($3.50\% \pm 2.96\%$) and the other two groups ($p > 0.05$). ② For oocytes chemically activated, the cleavage rate of the group excluded the first polar body was higher than those of the group without polar body and the control group ($75.45\% \pm 1.35\%$ vs. $64.81\% \pm 2.07\%$, $69.64\% \pm 2.51\%$, $p < 0.05$), and the blastocyst rate of the first polar body group was also higher than those of without polar body group and the control group ($24.54\% \pm 4.34\%$ vs. $12.96\% \pm 3.99\%$, $18.75\% \pm 1.87\%$, $p < 0.05$). After *in vitro* maturation for 42–44 hours porcine oocytes having excluded the first polar body can develop better than those without the first polar body, however porcine oocytes without the first polar body also can develop to the blastocyst stage after *in vitro* fertilization or chemical activation.

Key words: porcine; oocyte; polar body; *in vitro* fertilization; parthenogenetic activation; embryo culture

责任编辑 夏娟