

张 谊. 天府黑兔卵巢中卵泡发育的组织学研究[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(7): 204–207.

天府黑兔卵巢中卵泡发育的组织学研究

张 谊

(西昌学院动物科学学院, 四川西昌 615013)

摘要:为了探索天府黑兔卵巢中不同发育阶段卵泡的组织定量结构, 采用连续石蜡切片技术, 对 4 只天府黑兔母兔的卵巢进行组织切片, 在光学显微镜下观察, 并利用组织形态测量软件测量不同发育阶段卵泡的直径、卵母细胞的直径和透明带厚度。结果表明: 原始卵泡的直径为 $(40.23 \pm 0.27) \mu\text{m}$, 其卵母细胞的直径为 $(23.86 \pm 2.23) \mu\text{m}$; 初级卵泡的直径为 $(56.26 \pm 6.72) \mu\text{m}$, 其卵母细胞直径为 $(31.03 \pm 1.33) \mu\text{m}$; 次级卵泡的直径为 $(181.32 \pm 17.12) \mu\text{m}$, 其卵母细胞直径为 $(81.35 \pm 3.14) \mu\text{m}$; 三级卵泡的直径为 $(750.69 \pm 32.69) \mu\text{m}$, 其卵母细胞直径为 $(106.21 \pm 4.34) \mu\text{m}$ 。卵泡直径(x)和卵母细胞直径(y)在发育过程中的回归关系是 $y = 2.297x^{0.643}$ ($r^2 = 0.88$)。

关键词:兔; 卵泡发育; 组织学; 直径

中图分类号: S829.13 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)07-0204-03

随着现代繁殖技术的发展, 一些先进的繁殖技术, 如人工授精技术^[1]、同期发情技术^[2]、兔卵母细胞体外受精^[3-4]及其胚胎移植技术^[5]等逐步应用于兔的繁殖过程, 使其能够进行快速改良以提高生产性能, 极大推动了养兔业的发展。为了进一步发展兔的繁殖生物技术, 有必要对兔卵巢中卵泡的生长发育和卵母细胞发育进行组织学研究, 探讨兔卵泡发育和闭锁规律, 为最大限度地利用兔卵巢上卵泡的潜能奠定基础。

目前, 正常生理条件下兔卵巢组织学定量研究较少, 虞斌等用组织学方法对兔卵巢组织移植后进行了研究^[6]; 毛冠平等研究了孕马血清促性腺激素(PMSG)对兔进行超数排卵处理后的卵巢组织学结构^[7]; 张金友等在研究兔超数排卵效果时, 也对各种不同剂量单位 PMSG、人绒毛膜促性腺激素(hCG)处理的兔卵巢进行了组织学研究^[8]; 常兰等对高原兔的卵巢进行了组织结构观察^[9]。

天府黑兔是四川农业大学历时十余年培育的中型肉兔新品种。该兔全身毛色乌黑发亮、头短粗、眼黑色、耳直立、体躯宽深、后躯发达; 成年体质量 4~5 kg, 窝产仔数 8~12 只, 生长速度快, 适应性强。自然生理状态下, 天府黑兔卵巢卵泡发育方面的组织学研究尚未见报道。本研究通过组织切片与组织定量分析技术对其卵巢中卵泡和卵母细胞发育进行组织学测量, 并分析卵泡发育和卵母细胞形态之间的关系, 这对天府黑兔卵巢组织定量的深入研究以及充分利用其卵巢上卵母细胞的相关繁殖生物技术的应用具有理论和实践意义。

1 材料与方法

1.1 材料

4~5 月龄天府黑兔 4 只, 取自四川农业大学教学科研兔场, 采用单笼饲养、自由饮水、自然光照。

1.2 卵巢收集

兔麻醉后颈动脉放血处死, 剖开腹腔取出卵巢, 用 0.9% 生理盐水冲洗后放入 10% 中性福尔马林溶液中固定 48 h, 将卵巢皮质修剪成 15 mm × 15 mm × 5 mm 的薄片后, 再次在 10% 中性福尔马林溶液中固定 48~72 h。

1.3 石蜡切片的制作

卵巢在 10% 中性福尔马林溶液中固定后, 用全自动组织脱水机(Lecia, TP-8, German)在乙醇梯度溶液(70%、80%、90%、95%、99%、100%)中脱水, 透蜡, 石蜡包埋后用切片机(Lecia RM235, German)进行连续切片, 切片厚度 $6 \mu\text{m}$ ^[10], 然后经展片、脱蜡后, 进行 HE 染色、脱水, 二甲苯透明, 树脂(C7901, Sigma, USA)封片。

1.4 卵泡的分类

根据 Hafes^[11]对卵泡分类标准, 将卵泡依直径大小、透明带的形成、卵泡腔的出现分为原始卵泡、初级卵泡、次级卵泡、三级卵泡和成熟卵泡。成熟卵泡通常发生排卵, 在卵巢组织切片中呈空泡状。

1.5 组织切片观察与测定

切到卵母细胞核的切片称为中纬切片。用显微镜(Nikon, 90i, Japan)获取图像, 用 ACT-2U 生物图像分析软件(Nikon Laboratory Imaging Inc., Japan)测量中纬切片上的卵泡、卵母细胞直径和透明带厚度。

1.6 统计分析

测量的数据以“平均值 ± 标准差”表示, 并用 SAS8.1e 统计分析软件采用 Pearson 分析卵泡直径、卵母细胞直径和透明带厚度之间的相关性, 建立卵泡直径与卵母细胞直径、透明带厚度之间的回归关系。

2 结果与分析

2.1 卵巢的组织学结构

兔的卵巢组织结构包括生殖上皮、白膜(Al)、皮质(Co)和髓质(Me)。卵巢表面被覆扁平或立方的生殖上皮细胞, 生殖上皮下为致密的结缔组织构成的白膜(图 1-A)。皮质部在卵巢的外周, 染色较深, 含有不同发育阶段的卵泡、闭锁卵泡、基质和血管。皮质中原始卵泡(PrF)、初级卵泡(PF)分布

收稿日期: 2014-02-24

基金项目: 四川省教育厅科研项目(编号: 11ZA146)。

作者简介: 张 谊(1976—), 男, 四川仁寿人, 硕士, 副教授, 主要从事动物遗传育种与繁殖工作。E-mail: zhangyis707@163.com。

于皮质浅层。原始卵泡分布于皮质的外周,单个或三五成群聚集存在,数量较多。初级卵泡分布于皮质的外围,单个散在或 2~3 个集中分布,数量较多;次级卵泡(SF)多分布于皮质深层,数量少;三级卵泡突出于皮质表层,数量极少。髓质位于皮质深层,髓质含较多的弹性纤维,其中有许多较大的血管、淋巴管及神经(图 1-B)。

2.2 卵泡形态特征

原始卵泡呈圆形或卵圆形,由 1 个大而圆的卵母细胞和外包的 1 层扁平卵泡细胞构成,分布在卵母细胞周围。卵母细胞呈球形,HE 染色胞质呈粉红色,胞核大而圆,位于卵母细胞中央,核仁明显(图 1-C)。初级卵泡的体积比原始卵泡大,卵泡细胞发育为柱状或立方状细胞,并增至多层;当卵母细胞被 2~3 层立方卵母细胞包围时,卵泡细胞和卵母细胞之

间出现薄层透明带,HE 染色呈淡红色(图 1-D);初级卵泡因卵泡细胞的层数变化较大以及卵母细胞的生长,其直径大小差异较大。次级卵泡卵母细胞增大,颗粒细胞层数增多,透明带增厚,卵泡膜增厚且内外层清晰;当颗粒细胞增至 4~5 层时,颗粒细胞排列疏松,靠近卵母细胞的颗粒细胞紧密地包围着卵母细胞,卵母细胞与颗粒细胞间形成完整的透明带,同时颗粒细胞间出现大小不等的卵泡腔,卵泡腔里充满卵泡液(图 1-E)。三级卵泡的卵母细胞进一步增大,随着卵泡腔的融合增大和卵泡液的增多,卵泡的直径急剧增大,卵母细胞位于卵泡的一侧,与周围紧密排列的颗粒细胞一起形成卵丘,靠近透明带的颗粒细胞形成典型的放射冠结构,卵泡膜分化为内外 2 层(图 1-F)。试验中未观察到完整结构的成熟卵泡,只见排卵后的巨大卵泡腔,卵泡腔直径在 1 000 μm 以上。

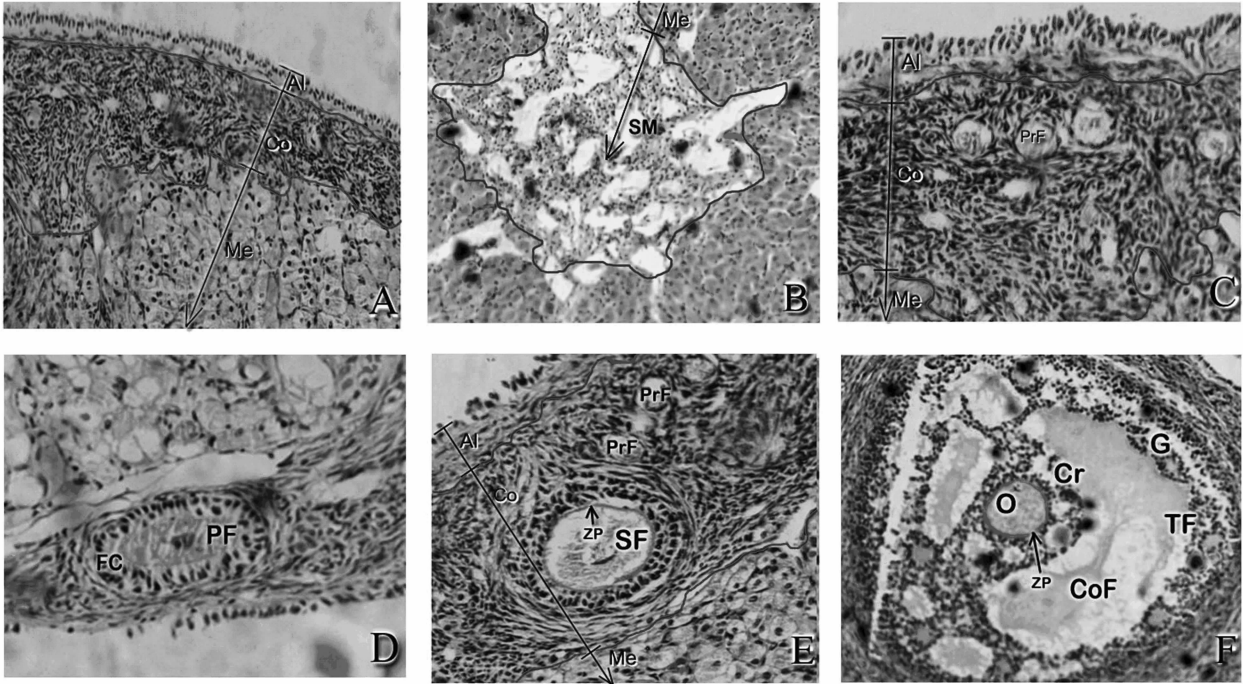


图1 兔卵巢的组织结构

2.3 卵泡直径、卵母细胞直径和透明带厚度

不同发育阶段卵泡直径、卵母细胞直径、透明带厚度见表 1。卵泡发育过程中,卵泡直径(原始卵泡 28.97~55.26 μm ,初级卵泡 45.69~87.56 μm)、卵母细胞直径(原始卵泡

15.23~37.16 μm ,初级卵泡 25.17~49.08 μm)、透明带厚度(次级卵泡 3.07~6.16 μm ,三级卵泡 5.29~9.13 μm) 在卵泡生长发育过程中都有明显的重叠,这说明卵泡的生长发育是一个动态的连续过程。

表 1 天府黑兔的卵泡直径、卵母细胞直径和透明带厚度

种类	测定数 (n)	卵泡直径 (μm)	卵母细胞直径 (μm)	透明带厚度 (μm)
原始卵泡 (PrF)	252	40.23 \pm 1.27 (28.97~55.26)	23.86 \pm 2.23 (15.23~37.16)	—
初级卵泡 (PF)	158	56.26 \pm 6.72 (45.69~87.56)	31.03 \pm 1.33 (25.17~49.08)	—
次级卵泡 (SF)	106	181.32 \pm 17.12 (107.57~508.23)	81.35 \pm 3.14 (32.23~110.09)	3.58 \pm 0.13 (3.07~6.16)
三级卵泡 (TF)	29	750.69 \pm 32.69 (705.28.04~891.09)	106.21 \pm 4.34 (98.13~155.32)	7.49 \pm 0.47 (5.29~9.13)

2.4 卵母细胞直径与卵泡直径、透明带厚度的相关性

卵母细胞直径、卵泡直径与透明带厚度的 Pearson 相关分析见表 2。在卵泡发育过程中卵泡直径和卵母细胞直径呈极

显著正相关($r=0.786\ 0, P<0.01$),原始卵泡阶段 $r=0.526\ 8$ ($P<0.01$),初级卵泡阶段 $r=0.794\ 4$ ($P<0.01$),次级卵泡阶段 $r=0.566\ 1$ ($P<0.01$),三级卵泡阶段 $r=0.845\ 4$ ($P<$

0.01)。透明带厚度与卵母细胞直径也呈极显著正相关($r = 0.463\ 5, P < 0.01$),次级卵泡阶段 $r = 0.323\ 1 (P < 0.01)$;三级卵泡阶段 $r = 0.563\ 5 (P < 0.01)$ 。

种类	相关系数	
	卵泡直径与卵母细胞直径	卵母细胞直径与透明带厚度
全部时期	0.786 0 **	0.463 5 **
原始卵泡	0.526 8 **	—
初级卵泡	0.794 4 **	—
次级卵泡	0.566 1 **	0.323 1 **
三级卵泡	0.845 4 **	0.563 5 **

注: ** 表示相关极显著($P < 0.01$)。

2.5 卵泡直径与卵母细胞直径、透明带厚度的回归关系

卵泡直径和透明带厚度的回归关系可以用直线回归方程 $y = 0.006\ 8x + 2.688\ 2 (r^2 = 0.808\ 8)$ 拟合(图 2 - A)。随着卵泡的生长增大,透明带也在生长增厚,最后稳定在 8 ~ 10 μm 。卵泡直径和卵母细胞直径的回归关系方程是 $y = 2.296\ 5x^{0.642\ 9} (r^2 = 0.884\ 0)$ (图 2 - B),卵泡直径生长到 400 ~ 500 μm 时,卵母细胞的生长速度变慢,卵母细胞直径稳定在 160 ~ 180 μm 。

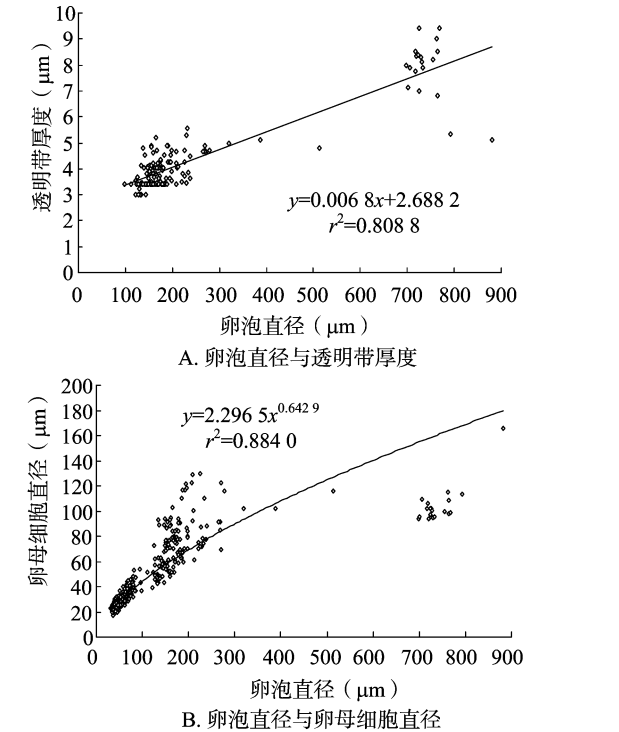


图2 卵泡直径与卵母细胞直径、透明带厚度的回归关系

3 讨论与结论

3.1 兔卵泡发育的组织学特征

兔的原始卵泡是由 1 个初级卵母细胞和单层扁平的卵泡细胞组成,在原始卵泡和初级卵泡中没有观察看到 2 个或 2 个以上卵母细胞的现象,这与猪等多胎家畜和大熊猫^[12]、双峰驼^[13]、羊驼^[14]有很大的差异,而与白唇鹿、东北梅花鹿^[15]相似。在大熊猫、双峰驼中能看到 1 个卵泡中有多个初级卵

母细胞的现象,在对羊驼卵巢卵泡系统进行研究时,观察到 1 个卵泡中有 4 个卵母细胞的现象。单卵泡多卵母细胞的现象可能存在种属特异性。

3.2 透明带的形成

透明带是由卵母细胞及颗粒细胞共同分泌某些物质形成的,其主要成分是黏多糖。兔的透明带是在卵母细胞外包围 2 ~ 3 层卵泡细胞的初级卵泡中开始出现,出现时间较早,这与牦牛^[16]、水牛^[17]相似,与川金丝猴^[18]、大熊猫^[12]、小熊猫^[19]、东北梅花鹿^[15]等不同(表 3)。兔透明带出现的时期晚于川金丝猴、大熊猫、小熊猫,早于东北梅花鹿,因此,透明带出现早晚有种属特异性。

表 3 部分动物透明带形成时期	
动物	透明带形成时期
兔	卵母细胞外包有 2 ~ 3 层卵泡细胞的初级卵泡形成透明带
川金丝猴	卵母细胞外包有 1 层矮柱状卵泡细胞时出现透明带 ^[18]
大熊猫	卵母细胞外包有 1 层矮柱状卵泡细胞时出现透明带 ^[12]
小熊猫	卵母细胞外包有 1 层矮柱状卵泡细胞时出现透明带 ^[19]
东北梅花鹿	卵母细胞外包有 3 ~ 4 层卵母细胞时出现透明带 ^[15]
牦牛	卵母细胞外包有 2 ~ 3 层卵泡细胞时出现透明带 ^[16]
水牛	卵母细胞外包有 2 ~ 3 层卵泡细胞时出现透明带 ^[17]

3.3 卵母细胞发育和卵泡生长的关系

在卵泡发育过程中,卵泡直径与卵母细胞直径之间呈显著相关,其研究结果与高立云等在牛卵泡发育中的研究结果类似^[20],表明在活体或收集的卵巢采卵过程中,可以通过卵泡直径来获得发育形态正常的卵母细胞。卵泡生长(x)与卵母细胞(y)的生长呈幂指数关系,可用方程 $y = 2.296\ 5x^{0.642\ 9} (r^2 = 0.884\ 0)$ 表示,这个结果与 Lintern - Moore 等^[21]所得到的卵泡生长(x)与卵母细胞(y)的生长呈直线关系($y = a + bx$)和 Kaur 等^[22]所得到的卵泡生长(x)与卵母细胞(y)的生长呈对数关系($\lg y = a + b \lg x$)不同,这说明卵泡生长与卵母细胞的生长的回归关系有着种属特异性。

参考文献:

[1] 杨玉荣,李艳玲. 家兔的人工授精技术[J]. 畜禽业,2007,11 (11):68 - 69.
[2] 张雅琼,秦应和,阎英凯,等. 不同剂量马绒毛膜促性腺激素对母兔同期发情效果的影响[J]. 中国畜牧杂志,2010,46(23):23 - 26.
[3] 范必勤,勃拉吉特 B G,杜克洛 W R,等. 家兔体外授精研究[J]. 江苏农业学报,1987,3(1):11 - 18.
[4] 唐修君,陈 丽,邹海军,等. 家兔卵母细胞体外授精研究[J]. 中国畜牧杂志,2007,43(15):15 - 17.
[5] 叶联顺,万 凌,刘冬芝,等. 探讨家兔超排卵后胚胎获取移植方法的实验研究[J]. 中国计划生育学杂志,2004,12(11):665 - 667.
[6] 虞 斌,许培熹,王秋伟,等. 兔卵巢组织移植后组织学研究[J]. 陕西医学杂志,2008,37(12):1571 - 1573.
[7] 毛冠平,张金友,刘云波,等. PMSG 对兔超数排卵的影响及卵巢组织学观察[J]. 中国养兔,2004(6):17 - 22.
[8] 张金友,田亚光,黄 贺,等. 兔超数排卵效果及早期胚胎体外发育的研究[J]. 中国畜牧杂志,2007,43(1):17 - 19.

陆艳凤,周明夏,孙国波. 不同剂量女贞、银杏叶提取物对苏北草鸡生产性能的影响[J]. 江苏农业科学,2014,42(7):207-209.

不同剂量女贞、银杏叶提取物对苏北草鸡生产性能的影响

陆艳凤¹, 周明夏¹, 孙国波^{1,2}

(1. 江苏农牧科技职业学院, 江苏泰州 225300; 2. 国家级水禽基因库, 江苏泰州 225300)

摘要:在基础日粮中添加不同比例(0.8%、1.0%、1.2%)女贞、银杏叶提取物,研究不同添加比例对苏北草鸡性能的影响。添加1%银杏叶提取物能显著提高鸡后期增重和饲料转化率,显著降低鸡腹脂率;屠宰率随着银杏叶提取物添加水平的提高有提高的趋势;添加1.2%银杏叶提取物能显著提高鸡全净膛率和血清球蛋白含量。添加1.0%、1.2%女贞提取物的试验组日增质量和料肉比显著好于对照组;所有组间屠宰率差异不显著,而试验组全净膛率、腹脂率与对照组差异显著(除添加0.8%女贞提取物试验组的全净膛率外)。添加不同浓度银杏叶提取物试验组的 GOT、GPT 含量在正常值范围内,说明银杏叶提取物的添加浓度与 GOT、GPT 不相关,GLB 含量随银杏叶提取物添加浓度的增加而升高。添加1.0%、1.2%女贞提取物试验组的 GLB、IgG 与对照组差异显著,且添加1.0%女贞提取物试验组整体的血液生化指标较其他3个组好。说明本试验中添加1.0%女贞、1.2%银杏叶对苏北草鸡的生长与保健具有较好的养殖功效。

关键词:苏北草鸡;女贞;银杏叶;生产性能

中图分类号: S831.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)07-0207-03

女贞、银杏叶具有良好的药用价值,现已广泛用于食品加工、医疗卫生等领域,其有效成分主要为黄酮类、萜类化合物(萜内酯)、聚戊烯醇等。经研究发现,女贞、银杏叶提取物对中枢神经系统、脑循环及血脑屏障、心血管系统以及免疫器官等作用明显,具有抗血小板活化因子、抑制血小板凝集、降低血脂、提高机体免疫功能等多种功效。为了探讨银杏叶对草鸡生长发育的影响,改善饲料成分结构,提升饲料营养与保健功效,本试验拟在已有研究的基础上,有针对性地研究女贞、银杏叶提取物对苏北草鸡生长、屠宰以及血清生化指标等的影响,旨在将女贞、银杏叶应用为绿色饲料添加剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

收稿日期:2013-10-21

作者简介:陆艳凤(1980—),女,江苏泰州人,硕士,助教,研究方向为动物遗传育种与繁殖。E-mail:lyf090904@163.com。

女贞、银杏叶提取物购自陕西西安飞达生物技术有限公司。以由江苏省家禽科学研究所保存的品种苏北草鸡为研究对象。

1.2 试验设计

本试验选用336羽苏北草鸡,随机分为7组,即对照组、A1、A2、A3、B1、B2、B3,其中对照组添加基础日粮,其余试验组分别是在基础日粮中添加0.8%银杏叶、1.0%银杏叶、1.2%银杏叶、0.8%女贞、1.0%女贞、1.2%女贞,每组设8个重复,每个重复6羽,试验期为42 d,并分为前期(0~21日龄)和后期(22~42日龄)2个阶段。

1.3 饲养管理

本试验中有关苏北草鸡的饲养管理参照苏北草鸡及其他草鸡的相关饲养要求。7日龄时,采用饮水方法接种新城疫、传染性支气管炎二联活疫苗(Lastoa+H120株),剂量为8 mL/羽;14日龄时,饮水接种中毒株法氏囊炎疫苗,剂量为10 mL/羽;21日龄时,胸肌注射新城疫疫苗(Lastoa),剂量为12 mL/羽。

[9]常 兰,李金英,李万财. 高原兔部分脏器的组织结构观察[J]. 中国兽医科技,2003,33(11):73-75.

[10]芮菊生. 组织切片技术[M]. 北京:人民教育出版社,1980.

[11]Hafes E. Reproduction in farm animals[M]. 5th ed. Philadelphia: Lea & Febiger Press,1987:143.

[12]冯文和,肖 蕾,赵 涛,等. 大熊猫卵泡及卵母细胞发育的研究[J]. 兽类学报,1996,16(3):161-165,235.

[13]陈秋生,刘宗平,陈北亨,等. 双峰驼卵巢的组织结构[J]. 中国兽医学报,2002,22(4):381-383.

[14]徐立仁,曹文广. 羊驼卵巢卵泡系统的观察[J]. 动物医学进展,1997,18(4):34-37.

[15]马泽芳,田长勇,张林媛,等. 东北梅花鹿卵泡发育的显微结构[J]. 经济动物学报,2007,11(2):70-75.

[16]蒙学莲,崔 燕,余四九,等. 牦牛发情周期中卵巢卵泡发育状

况的组织学观察[J]. 中国兽医科学,2006,36(1):57-61.

[17]冯贵雪,杨素芳,石德顺,等. 水牛腔前卵泡的分布及形态学研究[J]. 黑龙江畜牧兽医,2007(4):11-13.

[18]俞诗源,杨晓军,杨晓辉. 川金丝猴卵巢的组织学研究[J]. 兰州大学学报:自然科学版,2000,36(3):154-157.

[19]修云芳. 成体雌性大熊猫卵巢组织学观察[J]. 兽类学报,2010,30(3):310-316.

[20]高立云,高建明,吴学清,等. 牛卵巢内卵泡及卵母细胞生长发育的组织学研究[J]. 黑龙江畜牧兽医,2002(6):5-6.

[21]Lintern-Moore S, Peters H, Moore G P M, et al. Follicular development in the infant human ovary[J]. J Reprod Fertil,1974,39:53-64.

[22]Kaur P, Kaur B, Guraya S S. Follicular growth and kinetics in the Indian gerbil (*Tatera indica*) ovary during oestrous cycle [J]. Journal of Biosciences,1997,22(4):489-495.