

于鸿浩,闫海龙,朱海鲸,等. 山羊卵泡数量对卵母细胞体外成熟的影响[J]. 江苏农业科学,2015,43(9):232-234.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.09.076

# 山羊卵泡数量对卵母细胞体外成熟的影响

于鸿浩,闫海龙,朱海鲸,黄 帅,屈 雷

(榆林学院生命科学研究中心/陕西省陕北绒山羊工程技术研究中心,陕西榆林 719000)

**摘要:**分析山羊卵泡数量对卵母细胞体外成熟的影响,根据卵泡数量将卵巢分为 3 组,探讨卵泡多少对卵母细胞体外成熟的影响。卵泡数目大于 14 个的设为 I 组,卵泡数目介于 8~14 个之间的设为 II 组,卵泡数目在 1~7 个之间的设为 III 组。3 组卵巢来源的卵母细胞体外成熟率分别为 61.68%、70.26%、63.09%;II 组的卵母细胞体外成熟率显著高于其他 2 组。3 组之间孤雌激活胚、克隆胚的卵裂率和囊胚发育率无显著差异。来源于卵泡数介于 8~14 个卵巢的卵母细胞体外成熟率最高,卵巢卵泡数量仅影响卵母细胞的体外成熟率,对发育能力无影响。

**关键词:**山羊;卵巢;卵母细胞;体外成熟

**中图分类号:** S827.3

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1002-1302(2015)09-0232-03

卵母细胞体外成熟是在体外人工设定的条件下,初级卵母细胞经过一系列的生长发育最终形成具有受精能力的 M II 期成熟卵母细胞的过程。卵母细胞体外成熟可充分利用卵巢丰富的卵母细胞资源用于体外受精、体细胞克隆、转基因动物研究以及发育生物学机理等研究,是现代胚胎生物学研究的重要基础。通过超数排卵等方法获取成熟卵母细胞的成本较高,且资源有限,远远满足不了当前科研、生产的需求。目前主要的解决手段是采集屠宰场卵巢,获取大量未成熟的卵母细胞,通过体外培养成熟,进而应用于科研、生产。山羊卵母细胞体外成熟影响因素较多,主要包括运输温度、卵丘颗粒细胞、卵泡直径、激素、小分子化合物、培养时间等。屈雷等<sup>[1]</sup>、孙李明等<sup>[2]</sup>研究认为,卵巢运输温度在 25℃左右时,卵母细胞成熟率显著高于运输温度接近 37℃时的成熟率。刘海军等研究表明,卵丘颗粒细胞对卵母细胞体外成熟具有显著影响,卵丘颗粒细胞层数在 3 层以上的卵母细胞成熟率最好<sup>[3]</sup>。叶华虎等发现,直径小于 1.5 mm 卵泡内的卵母细胞仅有个别能完成成熟和卵裂,大于 1.5 mm 卵泡内的卵母细胞具有核成熟能力,直径大于 2.5 mm 卵泡内的卵母细胞能较好地支持胚胎继续发育<sup>[4]</sup>。Kordan 等研究表明,促卵泡素和促黄体素联合应用能明显提高山羊卵母细胞成熟率和受精后胚胎的发育率<sup>[5]</sup>。王艾平等研究表明,表皮生长因子对卵母细胞的体外成熟和卵裂发育具有明显的促进作用<sup>[6]</sup>。王超等发现,培养 24 h 或 26 h 的卵母细胞体外成熟率最好<sup>[7]</sup>。许杰等研究表明,繁殖季节卵母细胞的成熟率明显高于非繁殖季节<sup>[8]</sup>。屠宰场采集的山羊卵巢上卵泡数量差异较大,这可能与山羊年龄、生理状态、营养水平等因素有关。卵泡数量是否

影响卵母细胞的体外成熟以及后期的胚胎发育尚不清楚,也未见相关研究报道。本试验分析了不同卵泡数量卵巢来源的卵母细胞体外成熟情况、孤雌激活胚发育能力以及克隆胚发育能力,探讨卵泡数量对山羊卵母细胞体外成熟的影响,旨在为山羊体细胞克隆、转基因山羊及其他胚胎工程研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

本试验所用试剂如无特殊说明均购自 Sigma 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 卵巢分组 自当地屠宰场采集山羊卵巢,立即放入无菌的生理盐水(含青霉素、硫酸链霉素各 100 IU/mL)中,3 h 内运至实验室,卵巢到达实验室时的温度为 23~28℃。将卵巢用 28℃灭菌生理盐水(含硫酸庆大霉素 100 IU/mL)反复冲洗 3 次,剪去输卵管等附属组织,再用生理盐水反复清洗干净,计算卵巢表面卵泡数量,共统计 100 个卵巢,确定卵泡数量的最大值、最小值,对最大值与最小值的差值进行等分,最终确定卵泡数量大于 14 个的卵巢为 I 组,介于 8~14 个之间的为 II 组,介于 1~7 个之间的为 III 组。

1.2.2 卵母细胞的体外成熟培养 将分组的卵巢置于加有捡卵液的平皿中,用手术刀片切割 2~6 mm 卵泡,使得卵母细胞随卵泡液进入捡卵液,最后在体视显微镜下收集卵丘卵母细胞复合体(cumulus oocytes complexes, COCs)。捡卵液为 TCM199(GIBCO)培养液。将挑选的 COCs 用 37℃预热 2 h 的卵母细胞体外成熟液洗 3 次,转移到含 2 mL 成熟培养液的培养皿中,在 38.5℃、5%(体积分数)CO<sub>2</sub>、最大饱和湿度中培养 23 h。卵母细胞体外基础成熟液:TCM199 培养液添加 0.22 mg/L 丙酮酸钠、10 μg/mL FSH(宁波第二激素厂)、20 μg/mL LH(宁波第二激素厂)、1 μg/mL 17β-E<sub>2</sub>、20% 胎牛血清(GIBCO),同时添加 1%(体积分数)的转铁蛋白-胰岛素-亚硒酸钠(ITS)、10 ng/mL EGF。

1.2.3 卵母细胞体外成熟率的统计 卵母细胞成熟培养后,将 COCs 移入 3 g/L 透明质酸酶溶液中,用移液枪反复吹打卵

收稿日期:2014-10-10

基金项目:国家转基因重大专项(编号:2013ZX08008-002);陕西省科技厅农业科技攻关项目(编号:2011K01-05);榆林学院高层次人才科研启动基金(编号:11GK05)。

作者简介:于鸿浩(1983—),男,内蒙古兴安盟人,博士,副教授,主要从事家畜大动物遗传资源研究。E-mail:geneyhh@126.com。

通信作者:屈 雷,博士,教授,主要从事山羊遗传育种、繁殖技术研究。E-mail:ylqulei@126.com。

母细胞,去除外周颗粒细胞,用操作液洗 3 次,操作液为 TCM199 添加 20% 的胎牛血清,最后于显微镜下挑选具有第 1 极体的卵母细胞,具有极体的细胞与培养细胞的比值即为成熟率。

1.2.4 手工克隆胚的构建 山羊手工克隆胚的构建参照于鸿浩等的方法<sup>[9-10]</sup>进行。利用链酶蛋白酶去除卵母细胞透明带,将其转入操作液中恢复 15 min 以上,然后将其转移至含有细胞松弛素 B 的操作液中进行手工去核,去核时利用胚胎切割刀切除靠近极体部位三分之一左右的卵母细胞胞质。收集无核的卵母细胞胞质作为受体,40 d P4 ~ P6 代陕北白绒山羊胎儿成纤维细胞为供核细胞。分别转移受体细胞、供体细胞至植物血凝素溶液中,形成 2 个受体细胞夹杂 1 个供体细胞的复合体。细胞复合体经电融合后形成克隆胚,再用 ionomycin、6 - DMAP 联合激活。

1.2.5 克隆胚的培养 将激活的克隆胚胎移入 G1 胚胎培养液(上海内湖国际贸易有限公司)中进行体外培养。48 h 后检查卵裂情况,将形态良好的分裂卵移入 G2 培养液(上海

内湖国际贸易有限公司)中,继续培养至第 6 天,检查胚胎发育情况。克隆胚培养条件为 38.5 ℃、5% (体积分数)CO<sub>2</sub>、最大饱和湿度。

1.2.6 成熟卵母细胞孤雌激活 将挑选的成熟卵母细胞转移到含 5 μmol/L ionomycin 的 TCM199 培养液中激活 5 min,用操作液洗 3 次,最后转移到 2.5 mmol/L 6 - 甲基氨基嘌呤培养液中,在 38.5 ℃、5% CO<sub>2</sub>、最大饱和湿度的培养箱中作用 4 h,按照克隆胚培养方法进行培养。

1.3 数据处理 采用 SPSS 统计软件进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 不同卵巢来源的卵母细胞体外成熟率 I、II、III 组卵巢来源的卵母细胞体外成熟率分别为 61.68%、70.26%、63.09%。II 组卵母细胞体外成熟率显著高于 I 组、III 组。I 组、III 组之间成熟率无显著差异(表 1)。

表 1 不同卵巢来源的卵母细胞体外成熟率

组别	成熟率 (%)					
	重复 1	重复 2	重复 3	重复 4	重复 5	平均
I	61.90	58.56	65.22	66.23	56.47	61.68 ± 4.19a
II	65.04	66.67	70.23	74.80	74.53	70.26 ± 4.44b
III	58.46	63.06	61.73	64.86	67.31	63.09 ± 3.32a

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著。下表同。

2.2 不同卵巢来源的卵母细胞孤雌激活卵裂率 对具有第一极体的成熟卵母细胞进行孤雌激活,孤雌激活胚经过体外培养 48 h 后观察卵裂情况。I、II、III 组孤雌激活胚的卵裂率分别为 76.00%、74.00%、79.33%。3 组之间差异不显著(表 2)。

表 2 不同卵巢来源的卵母细胞孤雌激活卵裂率

组别	卵裂率 (%)					
	重复 1	重复 2	重复 3	重复 4	重复 5	平均
I	83.33	70.00	86.67	66.67	73.33	76.00 ± 8.63a
II	70.00	63.33	80.00	83.33	73.33	74.00 ± 7.96a
III	73.33	80.00	83.33	76.67	83.33	79.33 ± 4.35a

2.3 不同卵巢来源的卵母细胞孤雌激活囊胚率 孤雌激活培养至第 6 天观察囊胚发育情况。I、II、III 组孤雌激活囊胚发育率分别为 20.89%、18.19%、21.60%。3 组之间差异不显著(表 3)。

表 3 不同卵巢来源的卵母细胞孤雌激活囊胚率

组别	囊胚率 (%)					
	重复 1	重复 2	重复 3	重复 4	重复 5	平均
I	16.00	23.81	26.92	15.00	22.73	20.89 ± 5.17a
II	19.04	21.05	16.67	16.00	18.18	18.19 ± 2.00a
III	21.43	20.83	24.00	21.74	20.00	21.60 ± 1.50a

2.4 克隆胚卵裂率 细胞克隆胚,克隆胚培养 48 h, I、II、III 组卵裂率分别为 73.37%、72.53%、73.56%。3 组之间差异不显著(表 4)。

表 4 不同卵巢来源的卵母细胞克隆胚卵裂率

组别	卵裂率 (%)					
	重复 1	重复 2	重复 3	重复 4	重复 5	平均
I	75	72.73	70.27	65	83.87	73.37 ± 6.94a
II	66.67	70.27	73.68	78.13	73.91	72.53 ± 4.30a
III	67.74	81.58	78.13	70	70.37	73.56 ± 5.95a

2.5 克隆胚囊胚发育率

克隆胚培养至第 6 天观察发育情况, I、Ⅱ、Ⅲ组克隆胚

囊胚发育率分别为 12.82%、12.06%、10.88%, 3 组之间差异不显著(表 5)。

表 5 不同卵巢来源的卵母细胞克隆胚囊胚发育率

组别	囊胚率(%)					
	重复 1	重复 2	重复 3	重复 4	重复 5	平均
I	10.31	15.67	9.25	6.08	16.84	12.82±2.55a
Ⅱ	18.31	13.60	8.37	15.76	11.00	12.06±4.29a
Ⅲ	15.60	9.11	16.37	8.13	12.22	10.88±2.75a

3 结论与讨论

哺乳动物卵母细胞成熟过程非常复杂,主要包括卵母细胞核成熟、胞质成熟。卵母细胞核成熟过程主要表现为生发泡破裂、MⅠ期赤道板的形成、同源染色体分离、MⅡ期纺锤体形成、第一极体排出、受精之后第二极体的排出。卵母细胞体外成熟过程中,生发泡破裂代表卵母细胞减数分裂启动,第一极体排出标志着卵母细胞体外成熟,可以受精。与核成熟相比,胞质成熟更为复杂,包括卵母细胞内部各细胞器形态改变和功能建立以及供减数分裂与早期胚胎发育相关的 mRNA 转录、翻译与修饰,卵母细胞只有核与胞质都充分成熟时才能成功受精,支持胚胎发育<sup>[11]</sup>。本研究以排出的第一极体为标准判断卵母细胞核是否成熟,结果表明,不同卵巢来源的卵母细胞核体外成熟明显不同,来源于Ⅱ组卵巢的卵母细胞体外成熟培养后第一极体排出率显著高于其他来源的卵母细胞;以孤雌激活胚和体细胞克隆胚的卵裂率、囊胚发育率判断不同卵巢来源的卵母细胞胞质成熟情况,结果表明,不同来源的体外成熟卵母细胞支持孤雌激活胚、体细胞克隆胚发育的能力是相同的。可见,山羊卵泡数量仅影响卵母细胞的核成熟率。卵母细胞成熟发育过程中,激活细胞核功能非常重要<sup>[12]</sup>。从单层扁平颗粒细胞包围的卵母细胞到早期有腔卵泡阶段的卵母细胞,其核仁是由染色质丝缠绕而形成的网状结构,随着 rRNA 合成的增加,核仁由 RNA 合成场所转变为 RNA 贮存场所<sup>[13]</sup>。此外,核孔越来越明显,密度增加,核周隙越来越难以分辨。电镜结果显示,生发泡期卵母细胞的核仁由颗粒性纤维成分、空泡及纤维中心组成,染色质高度疏松,有明显的核膜、核仁,核仁正在致密化或已发生致密化。只有核仁完全致密化,核仁周围有染色质相伴分布,卵母细胞才获得恢复减数分裂的能力<sup>[13-14]</sup>。卵母细胞成熟培养开始后不久,核膜先是有轻微打折,核膜孔消失;与核膜分解行为同步,染色体扩散,显著凝集在核膜内缘;然后发生核膜破裂,直至完全解散,加入内质网池,核内物质与核质混合,此过程即为生发泡破裂<sup>[15]</sup>。卵母细胞发生生发泡破裂,完成第 1 次减数分裂后,形成次级卵母细胞进行至第 2 次减数分裂中期(MⅡ期),并排出第一极体。因此深入研究挖掘卵泡数量对核成熟的影响机制应以细胞核形态、功能变化为切入点。卵巢卵泡数量差异形成可能与动物个体年龄、生理状态、营养水平有关,但由于屠宰场屠宰的动物来源较多、年龄和生理状态等不确定性导致探寻卵巢卵泡数量差异成因较为困难。本研究结果表明,山羊卵巢卵泡数量对山羊卵母细胞体外成熟率具有影响,卵泡数量为 8~14 个时卵巢来源卵母细胞体外成熟率最高。建议山羊体细胞克隆、转基因动物制备、体外受精等胚胎工程研究选择收集此类卵巢中的卵母细胞作为试验

材料。

参考文献:

[1] 屈雷,雷安民,闫海龙,等. 陕北白绒山羊种公羊的体细胞克隆[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2012,40(9):29-34,40.

[2] 孙新明,戴彩华,罗婷. 卵巢运输温度及卵母细胞促成熟因子对山羊卵母细胞体外成熟和体外受精的影响[J]. 生物技术通报,2010(8):183-187.

[3] 刘海军,马群,王儒,等. 来源和质量不同对山羊卵母细胞体外成熟率的影响[J]. 华北农学报,2012,27(2):117-120.

[4] 叶华虎,袁菊芳,刘宏伟,等. 不同直径山羊卵泡卵母细胞的发育特征及体外发育能力[J]. 中国比较医学杂志,2008,18(10):32-36.

[5] Kordan W, Strzezek J, Fraser L. Functions of platelet activating factor (PAF) in mammalian reproductive processes: a review[J]. Polish Journal of Veterinary Sciences, 2002, 6(1):55-60.

[6] 王艾平,魏泓,孙新民,等. 表皮生长因子、巯基乙醇和亚硫酸对山羊体外胚胎生产的影响研究[J]. 中国草食动物, 2005, 25(1):3-6.

[7] 王超,郝泽东. 不同培养条件、培养时间和温度对山羊卵母细胞体外成熟的影响[J]. 西北农业学报, 2007, 16(2):7-9.

[8] 许杰,马恒东. 季节因素对山羊卵母细胞成熟的影响[J]. 畜牧与兽医, 2008, 40(6):53-54.

[9] 于鸿浩,闫海龙,敬晓琪,等. 陕北白绒山羊体细胞手工核移植研究[J]. 四川动物, 2013, 32(6):819-823.

[10] Yu H H, Guo Z L, Guo S C, et al. Interspecies embryo reconstruction in Tibetan antelope *Pantholops hodgsonii* by handmade cloning[J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 10(12):2360-2365.

[11] Goto H, Iwata H, Takeo S, et al. Effect of bovine age on the proliferative activity, global DNA methylation, relative telomere length and telomerase activity of granulosa cells[J]. Zygote, 2013, 21(3):256-264.

[12] Fair T, Hulshof S C, Hyttel P, et al. Nucleus ultrastructure and transcriptional activity of bovine oocytes in preantral and early antral follicles[J]. Molecular Reproduction and Development, 1997, 46(2):208-215.

[13] Fair T, Hyttel P, Greve T, et al. Nucleus structure and transcriptional activity in relation to oocyte diameter in cattle[J]. Molecular Reproduction and Development, 1996, 43(4):503-512.

[14] Miao Y L, Kikuchi K, Sun Q Y, et al. Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility[J]. Human Reproduction Update, 2009, 15(5):573-585.

[15] Rajikin M, Yusoff M, Abdullah R. Ultrastructural studies of developing goat oocytes *in vitro*[J]. Theriogenology, 1994, 42(6):1003-1016.