

宋尚桥,马国围,曾素先,等. 对猪小腔卵泡孤雌激活胚胎发育力的初步探索[J]. 江苏农业科学,2020,48(16):205-207.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.16.040

对猪小腔卵泡孤雌激活胚胎发育力的初步探索

宋尚桥¹, 马国围¹, 曾素先², 严瑾¹, 孙翠翠¹, 李鑫¹, 黎宗强¹

(1. 广西大学动物科学技术学院, 南宁广西 530004; 2. 南宁市江南区沙井街道办事处水产畜牧兽医站, 南宁广西 530045)

摘要:为探讨直径为 2 mm 以下和 2~6 mm 猪卵泡卵母细胞的体外培养分裂率与囊胚率差异,采用相同体外成熟培养条件,来培养从不同直径的 2 种卵泡中所抽出的卵母细胞,在卵母细胞成熟培养后 44~48 h,对卵母细胞进行化学激活和体外培养,观察胚胎体外发育能力;在培养 48 h 时进行分裂数据统计,培养 168 h 时统计囊胚个数。结果发现,2 mm 以下猪卵泡卵母细胞孤雌激活后胚胎的体外培养平均分裂率与 2~6 mm 猪卵泡卵母细胞孤雌激活后胚胎的体外培养平均分裂率差异显著,分别为 62.46%、81.76% ($P < 0.05$);2 mm 以下猪卵泡卵母细胞孤雌激活后胚胎的体外培养平均囊胚率与 2~6 mm 猪卵泡卵母细胞孤雌激活后胚胎的体外培养平均囊胚率差异不显著,分别为 11.71%、15.30%。说明正常卵泡、小腔卵泡的卵母细胞在体外成熟后,孤雌激活胚分裂率依次降低,孤雌胚胎的分裂能力随卵泡直径的增大而增强;正常卵泡、小腔卵泡的卵母细胞体外成熟后,孤雌激活胚囊胚率随卵泡直径的增大有一定增高,但变化不显著。

关键词:猪;小腔卵泡;孤雌激活;分裂率;囊胚率

中图分类号: S852.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)16-0205-03

对于卵母细胞成熟体系、胚胎发育体系、胚胎干细胞体系的建立及体细胞核移植效率的提高仍需要依赖于各技术环节的进一步完善^[1],而孤雌激

活胚胎的准备是其中不可或缺的一个环节,也是非常重要的影响因素之一^[2]。因此,对于小腔卵泡孤雌激活胚胎发育率的研究显得十分必要。在猪卵巢卵母细胞体外成熟、孤雌激活方面的研究,目前已取得关键性突破^[3]。只有卵泡直径达 2 mm 时,卵泡内的卵母细胞才具有体外成熟的能力^[4]。卵巢上分布着许许多多的细胞,不仅包括少量的大腔卵泡卵母细胞,还包括数以万计的腔前卵泡卵母细胞和小腔卵泡细胞,这些细胞是供给进行体外培养

收稿日期:2019-09-21

基金项目:广西壮族自治区科技计划-重点研发计划(编号:桂科 AB16380072)。

作者简介:宋尚桥(1995—),男,安徽滁州人,硕士研究生,主要从事动物繁殖生物学研究。E-mail:1157677030@qq.com。

通信作者:黎宗强,副教授,主要从事动物繁殖生物学特性研究。E-mail:zqingli@gxu.edu.cn。

calf diarrhoea and enteropathogen shedding in New Zealand dairy farms[J]. The Veterinary Journal, 2015, 203(2): 155-160.

[24] 高立战,刘军,赵学前,等. 犊牛腹泻主要病原菌多重 PCR 方法的建立[J]. 动物医学进展, 2010, 31(3): 30-34.

[25] 李决,林雪. 在犊牛腹泻粪便中检出轮状病毒[J]. 郑州牧业工程高等专科学校学报, 1987(1): 24-25.

[26] 关平原,郭延春. 应用直接透射电镜配合免疫电镜诊断牛轮状病毒性腹泻[J]. 中国兽医杂志, 1989, 15(12): 8-9.

[27] Dhamax K, Chauhan R S, Mahendran M, et al. Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals[J]. Vet Res Commun, 2009, 33: 1-23.

[28] 荔霞,刘永明,齐志明,等. 兰州地区犊牛轮状病毒性腹泻的流行病学调查[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2010(2): 105-107.

[29] 穆杨,柯霓霞,许信刚,等. 犊牛腹泻病原的分离鉴定[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2007(5): 79-81.

[30] 尹德琦,何润霞,龙森. 犊牛腹泻病原实验室诊断研究进展

[J]. 畜牧与饲料科学, 2015, 36(1): 90-94.

[31] 王丹阳,王旭荣,张康,等. 牛病毒性腹泻病毒、大肠杆菌和奇异变形杆菌混合感染致犊牛腹泻的研究[J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(1): 189-195.

[32] 吴城,金学浩,曾广谥,等. 福建省牛流行性腹泻病原——牛轮状病毒的研究[J]. 畜牧兽医学报, 1984, 15(4): 249-256.

[33] Walker W L, Epperson W B, Wittum T E, et al. Characteristics of dairy calf ranches: morbidity, mortality, antibiotic use practices and biosecurity and biocontainment practices[J]. J Dairy Sci, 2012, 95(4): 2204-2214.

[34] Smith R L, Sanderson M W, Jones R, et al. Economic risk analysis model for bovine viral diarrhea virus biosecurity in cow-calf herds[J]. Preventive Veterinary Medicine, 2014, 113(4): 492-503.

[35] George M B, John M G, James F E. Biosecurity for neonatal gastrointestinal diseases[J]. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 2002, 18(1): 7-34.

所需成熟卵母细胞的潜在重要支柱^[5]。早在 1996 年,Tsafiri 等在体外培养猪 1~2 mm 卵泡的卵母细胞,获得 15%~25% 的成熟率^[6]。本研究对猪小腔卵泡卵母细胞的体外成熟孤雌激活胚胎发育率进行探索,以期对猪的多种试验研究提供宝贵材料,如体外受精试验、核移植试验等,为对卵母细胞在体外培养过程中发育机制的探索有重要价值和研究意义^[7-8]。因此,直径<2 mm 的卵泡的卵母细胞体外成熟的孤雌激活发育能力及其机制将逐渐被揭示。通过对猪小腔卵母细胞孤雌激活后体外发育能力的研究,为解决猪卵巢资源紧张提供新的资源。

1 材料

1.1 试验样品的采集

从广西大学附近的屠宰场获得新鲜猪卵巢,将其放置于 30~35 ℃ 装有生理盐水的保温瓶中,在 1 h 内运回实验室进行相关的试验操作。

1.2 主要试剂

本研究所用化学试剂除特别指明外,均购自 Sigma 公司,如洗卵液(CCM)、胚胎培养液(NCSU)、体外成熟培养液(M)、离子霉素、2,6-二甲苯酚(6DMP);促卵泡激素(FSH)和促黄体生成素(LH),购自中国科学院动物研究所;培养用仪器为 TCM-199,购自 Gibco 公司;一次性塑料皿,购自 NUNC 公司。

2 方法

2.1 卵母细胞的收集

用带针头的注射器分别抽取卵巢表面上直径<2 mm 和直径为 2~6 mm 的卵泡的卵母细胞,并将 2~6 mm 卵泡的卵母细胞设为第 1 组,直径<2 mm 卵泡的卵母细胞设为第 2 组。在实体显微镜下用玻璃吸管吸取带 2 层卵丘细胞以上、胞质均匀的卵母细胞,之后以具有完整卵丘细胞层的标准筛选卵母细胞,将筛选得到的卵母细胞用 CCM 洗净后,以 30~60 枚为 1 组移入含 1.5 mL 成熟培养液的玻璃平皿(30 mm×10 mm)中,设定体外成熟培养条件为:38.5 ℃、5% CO₂ 及饱和湿度。将不同组的卵母细胞作好标记分开成熟培养。

2.2 猪卵母细胞的孤雌激活

在猪卵母细胞体外成熟培养 44~48 h 后,向其中加入含 0.1% 透明质酸酶的洗卵液除去卵丘细

胞,并用枪头轻轻吹打。然后在 40 倍体视显微镜下检查卵母细胞是否排出第一极体,以排出第一极体作为卵母细胞核成熟的标志。挑取核成熟卵母细胞,采用 5 μmol/L 离子霉素处理 5 min 后,用 2.5 mmol/L 二甲氨基嘌呤处理 4 h,最后移至 100 μL/滴的胚胎培养基中置于培养箱中培养 168 h,并设定培养条件为:39 ℃、5% CO₂ 饱和湿度。将不同组胚胎作好标记分开培养。

2.3 猪孤雌激活胚胎发育力数据统计

在胚胎培养 48 h 时,统计孤雌激活胚胎发育分裂率;在培养 168 h 时,统计孤雌激活胚胎发育囊胚率。所得试验结果均用 SPSS 11.0 软件进行统计分析,对计量资料进行 *t*-检验分析,*P*<0.05 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 猪小腔卵泡与正常直径卵泡卵母细胞孤雌激活胚胎分裂率

由表 1 可知,2 mm 以下卵泡卵母细胞(小腔卵泡卵母细胞)孤雌激活后胚胎的体外培养平均分裂率与 2~6 mm 猪卵泡卵母细胞(正常卵泡卵母细胞)孤雌激活后胚胎的体外培养平均分裂率分别为 62.46%、81.76%,二者差异显著(*P*<0.05)。表明从不同直径的卵泡中抽出的卵母细胞孤雌激活后,孤雌激活胚分裂率不同,孤雌胚胎的分裂能力随卵泡直径的增大而增强。

3.2 猪小腔卵泡与正常直径卵泡卵母细胞孤雌激活胚胎囊胚率

由表 1 可知,2 mm 以下卵泡卵母细胞孤雌激活后胚胎的体外培养平均囊胚率与 2~6 mm 猪卵泡卵母细胞孤雌激活后胚胎的体外培养平均囊胚率分别为 11.71%、15.30%,二者差异不显著(*P*>0.05)。表明从正常卵泡、小腔卵泡中抽出的卵母细胞孤雌激活后,孤雌激活胚囊胚率与卵泡直径大小有一定的关系,囊胚率随卵泡直径的增大而增高,但正常卵泡与小腔卵泡所抽出的卵母细胞囊胚率相比,差异不显著。

表 1 猪卵泡卵母细胞孤雌激活胚胎发育力		
类型	猪卵泡卵母细胞孤雌激活胚胎发育力	
	分裂率(%)	囊胚率(%)
小腔卵泡卵母细胞	62.46±18.00a	11.71±1.28a
正常卵泡卵母细胞	81.76±22.10b	15.30±1.43a

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著(*P*<0.05)。

4 讨论

进入 20 世纪 90 年代后,有更多学者投身于小腔卵泡的研究,猪小腔卵泡的体外成熟研究已经相当普遍,但体外成熟小腔卵泡的孤雌激活研究较少^[9-10]。Tsafirri 等对猪的 1~2 mm 卵泡卵母细胞进行体外培养,发现其成熟率达到 15%~25%^[11]。家畜小腔卵泡卵母细胞仍然需要经历很多复杂多变的生理生化过程才能具有恢复和完成成熟分裂的能力。相关研究表明,猪卵母细胞的成熟率和卵泡直径呈正比^[12]。在体内正常生理条件下,卵母细胞发育程度与卵泡直径呈正比。猪小腔卵泡卵母细胞正处于生长后期,进行活跃的 RNA 合成,其体外成熟能力低于 2~6 mm 卵泡的卵母细胞^[13-14]。研究显示,2 mm 以下卵泡和 2~6 mm 卵泡的卵母细胞孤雌激活胚胎分裂率分别为 52.63%、80.39%,二者有显著差异^[7]。

囊胚率是分析胚胎发育情况的一个指标^[15]。直至目前,大多数的科学研究做猪卵母细胞孤雌激活试验时,都热衷于以胞质均匀、包裹多层卵丘细胞的卵母细胞为研究对象^[16]。已有的相关研究表明,扩展的卵丘细胞可以通过调节物质的通透性,诱捕卵母细胞排出的有害物质,从而达到有效抑制卵母细胞死亡和退化的效果^[17]。但从小腔卵泡中抽出的卵母细胞孤雌激活后的囊胚率却很高,和 2~6 mm 卵泡的卵母细胞孤雌激活胚胎的囊胚率差异不显著,表明卵泡大小对卵母细胞体外成熟、体外发育有重要影响。

5 结论

研究发现,正常卵泡、小腔卵泡的卵母细胞体外成熟后,孤雌激活胚分裂率依次降低,说明孤雌胚胎的分裂能力随卵泡直径的增大而增强;正常卵泡、小腔卵泡的卵母细胞体外成熟后,孤雌激活胚囊胚率随卵泡直径的增大有一定的增高,但变化不显著;从猪小腔卵泡中抽出的卵母细胞有一定的发育能力,在收集卵母细胞的时候,也应该适当挑取一部分直径小于 2 mm 的小腔卵泡,增加卵母细胞的数量,为试验提供更多的材料。

参考文献:

[1] Oswald J, Engemann S, Lane N, et al. Active demethylation of the

paternal genome in the mouse zygote[J]. *Current Biology*, 2000, 10 (8): 475–478.

[2] 丁威, 惠锋明, 周波, 等. 二花脸猪卵巢卵泡形成与早期发育[J]. *中国猪业*, 2013, 8(增刊 1): 30–33.

[3] Han Y M, Kang Y K, Koo D B, et al. Nuclear reprogramming of cloned embryos produced *in vitro* [J]. *Theriogenology*, 2003, 59 (22): 33–44.

[4] Fulka J, Fulka H, Slavik T, et al. DNA methylation pattern in pig *in vivo* produced embryos [J]. *Histochemistry and Cell Biology*, 2006, 126(2): 213–217.

[5] 郑培栋, 王新庄, 夏霞. 哺乳动物小腔卵泡卵母细胞体外成熟的研究进展[J]. *河南农业大学学报*, 2007, 41(2): 237–241.

[6] Tsafirri A, Chun S Y, Zhang R, et al. Oocyte maturation involves compartmentalization and opposing changes of cAMP levels in follicular somatic and germ cells: studies using selective phosphodiesterase inhibitors [J]. *Developmental Biology*, 1996, 178 (2): 393–402.

[7] Kang Y K, Park J S, Koo D B, et al. Limited demethylation leaves mosaic-type methylation states in cloned bovine pre-implantation embryos [J]. *The EMBO Journal*, 2002, 21: 1092–1100.

[8] Stone BA, Quinn P, Seamark RF. Energy and protein sources for development of pig embryos cultured beyond hatching *in vitro* [J]. *Journal of Cell Science*, 1984, 7: 405–412.

[9] 卢晟盛, 谭世俊, 石德顺. 不同成熟时间对黄牛小腔卵泡卵母细胞成熟率的影响[J]. *广西畜牧兽医*, 2000, 16(1): 12–13.

[10] Petyers R M, Johnson B H, Reed M L, et al. Glucose, glutamine and inorganic phosphate in early development of the pig embryo *in vitro* [J]. *Reproduction*, 1990, 89: 269–275.

[11] Tsafirri A, Channing C P. Influence of follicular maturation and culture conditions on the meiosis of pig oocytes *in vitro* [J]. *Reproduction*, 1975, 43: 149–152.

[12] Petr J, Tepla O. Effect of testosterone and dibutyryl (–AMP) on the meiotic competence in pig oocytes of various size categories [J]. *Theriogenology*, 1996, 46: 97–108.

[13] 何圆圆. 牛小腔卵泡体外培养体系二维法和三维法的比较 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018.

[14] 王寒阳, 李捷鑫, 李文瑞, 等. 不同直径的绵羊卵泡中卵母细胞核相及皮质颗粒分布特征分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2016, 43 (5): 1255–1262.

[15] Mayer W, Niveleau A, Walter J, et al. Embryogenesis – demethylation of the zygotic paternal genome [J]. *Nature*, 2000, 403 (6769): 501–502.

[16] 李翠玲, 李楠, 黄章虎, 等. 水牛小腔卵泡分离方法的初步研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2011, 38(11): 38–41.

[17] Gioia L, Barboni B, Turriani M, et al. The capability of reprogramming the male chromatin after fertilization is dependent on the quality of oocyte maturation [J]. *Reproduction*, 2005, 130(1): 29–39.