

猪卵母细胞体外成熟的影响因素

华再东¹ 郑新民² 魏庆信² 许厚强¹ 刘西梅² 李莉²

1. 贵州大学动物科学学院/贵州省动物遗传育种与繁殖重点实验室, 贵阳 550025;

2. 湖北省农业科学院畜牧兽医研究所/动物胚胎工程与分子育种湖北省重点实验室, 武汉 430064

摘要 通过采集屠宰场废弃猪卵巢, 体外分离和培养猪卵母细胞, 探讨基础培养基、激素、卵泡直径大小及卵丘细胞层数对猪卵母细胞体外成熟的影响。结果表明: 改良 TCM199(mTCM199) 较 NCSU-23 培养猪卵母细胞成熟率显著提高($P < 0.05$); 基础培养基中添加 PMSG、hCG 和 pFF, 卵母细胞体外成熟率(80.63%) 显著高于仅添加其中一种; 从卵泡直径 3~6 mm 和大于 6 mm 卵泡获得的卵丘卵母细胞复合体(COCs), 其体外培养成熟率(83.33%和 76.43%) 极显著高于卵泡直径在 3 mm 以下获得的 COCs 成熟率(30.94%); 根据卵丘细胞层数把 COCs 分为 A、B、C 3 级, 其中 A 级和 B 级卵母细胞成熟率差异不显著, 但都极显著高于 C 级卵母细胞的成熟率。

关键词 猪; 卵母细胞; 体外成熟; 卵丘卵母细胞复合体

中图分类号 S 814.8 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)03-0280-05

猪体细胞核移植(SCNT)以及孤雌激活(PA)等现代胚胎生物技术为开展抗病育种、提高肉质、生产转基因或者基因组修饰猪、建立人类疾病模型以及生物学基础研究诸多方面的探索提供了强大的技术支撑。而猪卵母细胞体外成熟(IVM)是体外受精技术(IVF)、胞浆单精子注射(ICSI)和 SCNT 技术等成功与否的关键^[1]。相对猪体内成熟的卵母细胞来说, IVM 的卵母细胞来源丰富, 价格低廉, 因而已成为 IVF、SCNT 研究的主流。在克隆胚的发育能力上, 体内成熟的卵母细胞要优于体外成熟的卵母细胞, 成功率高^[2-3]。

如何优化猪卵母细胞体外成熟体系, 使得卵母细胞核、质同步成熟, 获得较强的发育能力, 成为当今亟需解决的问题^[4]。然而, 猪卵母细胞的成熟是一个复杂的生理过程^[5], 主要包括细胞核和细胞质的变化, 同时又是一个受多因素调节的过程, 严格依赖其生长的卵泡环境^[6]。

本试验旨在通过研究猪卵母细胞体外成熟的主要影响因素, 旨在为体细胞核移植提供大量优质的第 2 次减数分裂中期(M II)卵母细胞提供基础

资料。

1 材料与方法

1.1 材料

洗卵液(DPBS)购自 Gibco 公司, 孕马血清促性腺激素(PMSG)、人绒毛膜促性腺激素(hCG)是宁波激素制品厂生产, 其他试剂如未特别注明, 均购自 Sigma 公司(St. Louse, MO, USA)。

卵母细胞体外培养基为改良 TCM199(mTCM199), 其成分为 3.05 mmol/L 葡萄糖、0.91 mmol/L 丙酮酸钠、0.57 mmol/L L-半胱氨酸、1 mmol/L L-谷氨酰胺、10 ng/mL 表皮生长因子(EGF)、10 IU/mL hCG、10 IU/mL PMSG、75 μ g/mL 青霉素、50 μ g/mL 硫酸链霉素、10% pFF; NCSU-23^[7]; DPBS; 脱卵液(0.1% 透明质酸酶的 DPBS)。

1.2 方法

1) 猪卵母细胞的采集和体外成熟培养。猪卵巢采自当地屠宰场, 置于盛有 28~37 $^{\circ}$ C 生理盐水(分别含青、链霉素 20 万 IU/L 和 15 万 IU/L)的保温

收稿日期: 2011-03-31

基金项目: 国家生物新品种培育专项(2008ZX08006-002; 2008ZX08006-003; 2008ZX08010-003; 2008ZX08011-004; 2009ZX08011-030B); 国际合作项目(2009BFA012)

华再东, 博士研究生, 研究方向: 细胞分子生物学. E-mail: huazaidong123@yahoo.com.cn

通讯作者: 许厚强, 教授, 研究方向: 动物生物技术. E-mail: houqiang0524@yahoo.com;

郑新民, 研究员, 研究方向: 动物生物技术. E-mail: anbit20@163.com

瓶内,2 h 内送回实验室,用适量生理盐水(28~37℃)冲洗3~5遍,采用10 mL注射器(16号针头)抽吸卵泡,卵泡液置于37℃水浴保温的50 mL离心管中,静置15~20 min,弃上清液,实体显微镜下观察,捡取卵丘卵母细胞复合体(COCs),转移到DPBS液滴中,冲洗3遍,再用IVM培养基洗涤3~5遍。

卵母细胞的成熟培养采用微滴法^[8],于39℃、100%湿度、5% CO₂培养箱中培养44 h后于倒置显微镜下观察卵丘细胞扩散状态,将扩散良好的卵母细胞移入0.1%的透明质酸酶中,反复吹打去除颗粒细胞,用DPBS洗卵液清洗2~3次,统计排出第一极体的卵母细胞数量,计算卵母细胞的成熟率(图1,图2)。

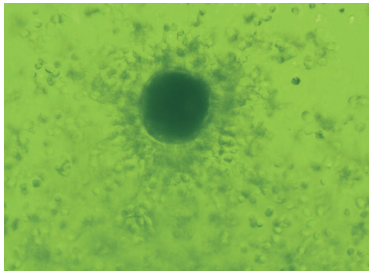


图1 成熟卵丘-卵母细胞复合体
Fig.1 Cumulus-oocyte complexes

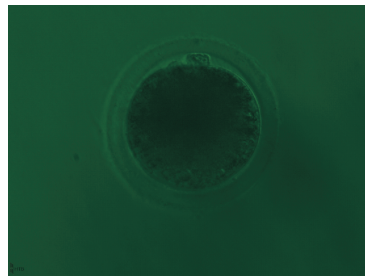


图2 去掉颗粒细胞的卵母细胞

Fig.2 Mature oocyte removed granulosa cells

2)猪卵泡液(pFF)制备。抽取卵巢上3~8 mm直径的卵泡,将抽取液放入离心管中离心(1 600 r/min)20 min,取上清液于超净工作台内,以0.22 μm滤膜过滤后分装于0.5 mL离心管中,-20℃冷冻保存备用。

1.3 试验设计与数据分析

1)试验1:mTCM199和NCSU-23两种培养基对猪卵母细胞体外成熟效果的比较。将COCs分别培养在mTCM199和NCSU-23培养基中,44 h后统计排出第一极体的卵母细胞数量,计算卵母细胞

的成熟率。同时制备pFF,为后续实验所用。

2)实验2:基础培养基中添加PMSG、hCG和pFF对卵母细胞体外成熟的效果的比较。将COCs分成4组进行,第1组在mTCM199中添加10 IU/mL PMSG,第2组添加10 IU/mL hCG,第3组添加10% pFF,第4组以上3种物质都添加。体外培养44 h后比较其成熟率。

3)实验3:不同卵泡直径获得COCs在体外培养的成熟率的比较。分别抽吸直径为3~6 mm、大于6 mm和3 mm以下卵泡,将COCs分别培养在mTCM199+10 IU/mL PMSG+10 IU/mL hCG+10% pFF中,44 h后观察卵母细胞的成熟率。

4)实验4:卵丘细胞的层数对卵母细胞体外成熟率的比较。根据包裹卵丘细胞层数将卵母细胞分A、B、C(A级:包裹5层以上卵丘细胞,B级:包裹3~5层卵丘细胞,C:包裹3层以下卵丘细胞)3级,将获得的COCs培养在mTCM199+10 IU/mL PMSG+10 IU/mL hCG+10% pFF中,44 h后比较其成熟率。

试验结果用卡方(χ^2)检验,进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 2种基础培养基对卵母细胞体外成熟的影响

从表1可以看出,使用mTCM199培养的卵母细胞成熟率(72.29%)显著高于NCSU-23(67.50%, $P<0.05$)。结果显示mTCM199更适于猪卵母细胞的体外成熟培养,将其作为后续实验的基础培养基。

表1 mTCM199和NCSU-23 2种培养基对猪卵母细胞体外成熟效果的比较¹⁾

Table 1 Effect of different culture medium of COCs on *in vitro* mature of oocytes

培养基 Culture medium	B级以上 COCs 数 No. level B and above of COCs	第一极体 排出数 No. of pb I	体外成熟率/% Mature rate
mTCM199	60(8)	347	72.29±3.56 a
NCSU-23	60(8)	305	63.50±3.82 b

1)同列数据字母相同者表示差异不显著($P>0.05$);不同小写字母者表示差异显著($P<0.05$),括号中数字为重复次数;下表同。Within the same column, the same valutes are not significantly different ($P>0.05$); values with different super-scripts are significantly different ($P<0.05$). Number in parentheses shows the repetitive times. The same as below.

2.2 PMSG、hCG 及 pFF 对猪卵母细胞体外成熟的影响

从表 2 可以看出,在基础培养基中仅添加 PMSG、hCG 或 pFF,其卵母细胞体外成熟率明显低于 mTCM199+10 IU/mL PMSG+10 IU/mL hCG+10% pFF 组($P<0.05$),表明 PMSG、hCG 和 pFF 在猪卵母细胞体外成熟过程中是非常必要的。

表 2 基础培养基中添加不同激素对卵母细胞体外成熟的影响

Table 2 Effect of different hormones composition in culture medium on *in vitro* mature of oocytes

成熟培养基组成 Culture medium composition	卵母细胞数 No. COCs	第一极体 排出数 No. pb I	体外成熟率/% Mature rate
mTCM199+ 10 IU/mL PMSG	83(5)	232	55.90±5.65 a
mTCM199+ 10 IU/mL hCG	76(5)	221	58.16±5.43 a
mTCM199+10% pFF	80(5)	206	51.50±8.17 a
mTCM199+ 10 IU/mL PMSG+ 10 IU/mL hCG+ 10% pFF	60(8)	387	80.63±3.54 b

2.3 卵泡直径大小对卵母细胞体外成熟的影响

从表 3 可以看出试验组 I (>6 mm)获得的卵

母细胞体外成熟率最高,但与试验组 II (3~6 mm) 差异不显著($P>0.05$),二者与试验组 III (<3 mm) 的成熟率差异极显著($P<0.01$)。

表 3 卵泡直径大小对猪卵母细胞体外成熟的影响¹⁾

Table 3 Effect of different size of follicle on *in vitro* mature of acolytes

组别 Groups	培养数 No. COCs	第一极体排出数 No. pb I	体外成熟率/% Mature rate
>6 mm	35(8)	214	76.43±4.19 A
3~6 mm	45(6)	225	83.33±3.07 A
<3 mm	40(8)	99	30.94±6.92 B

1) 同列数据字母相同者表示差异不显著($P>0.05$); 大写字母不同者表示差异显著($P<0.01$), 下表同。Within the same column, the same values are not significantly different($P>0.05$); values with different letters are very significantly different ($P<0.01$). The same as below.

2.4 卵丘细胞包裹层数对猪卵母细胞成熟的影响

从表 4 结果可见, A 级与 C 级卵丘扩展率差异显著($P<0.05$), A 级和 B 级在极体排出率上极显著高于 C 级($P<0.01$), 说明包裹 3 层以上卵丘颗粒细胞的卵母细胞更适合体外培养, 成熟率更高。

表 4 COCs 分级对猪卵母细胞成熟的影响

Table 4 Effect of different grade of COCs on *in vitro* mature of oocytes

COCs 分级 COCs level	COCs 数 No. of COCs	卵丘扩散数 No. of spread COCs	扩散率/% Spread rate	第一极体排出数 No. of pb I	成熟率/% Mature rate
A 级 Grade A	71(7)	492	98.99±0.88 A	437	87.92±5.89 A
B 级 Grade B	80(6)	426	88.75±0.67 A	365	76.04±5.97 A
C 级 Grade C	46(8)	267	72.55±0.58 B	156	42.39±6.56 B

3 讨论

mTCM199 和 NCSU-23 是当前应用最广,也是猪卵母细胞体外培养最有效的 2 种基础培养基^[9]。本试验采用 mTCM199 和 NCSU-23 培养基,结果发现前者培养卵母细胞的成熟率显著高于后者。该结果和潘登科等人^[10]的研究不一致;但与王海等人^[11]和徐小明等人^[12]的相同。本试验结果表明,使用 NCSU-23 为培养基的猪卵母细胞体外成熟效果较差,究其原因可能是因为 NCSU-23 配方相对复杂,称量产生误差,溶液配比中缺乏蛋白质组分,不能完全提供卵母细胞成熟过程所需的营养成分,从而不能使卵母细胞核成熟的缘故。

促性腺激素在卵母细胞成熟启动中发挥重要作用,PMSG 和 hCG 是成熟培养基中使用较多的促性

腺激素。在 mTCM199+10 IU/mL PMSG+10 IU/mL hCG+10% pFF 组卵母细胞体外成熟率显著高于其他 3 组,说明激素和 pFF 对卵母细胞体外成熟有促进作用。有些研究者认为猪卵母细胞体外培养的前 24 h 添加 PMSG 和 hCG,后 24 h 去除所有激素,不仅能提高卵母细胞的成熟率,而且成熟卵母细胞的质量也高,受精和发育更正常^[13]。本研究结果表明 PMSG 和 hCG 试验组的卵母细胞体外培养成熟率要显著高于不含 PMSG 或者 hCG 组,表明促性腺激素对卵母细胞体外成熟培养是非常必要的。

pFF 的成分极为复杂,含有大量来自血清的生化因子和卵母细胞及卵泡细胞的分泌因子。有关 pFF 对猪卵母细胞成熟及发育的影响,不同学者报道的结果不太一致^[14-15],可能与 pFF 所含的因子随

机体内分泌状态的变化而变化有关。此外有报道认为从不同直径卵泡获得的卵泡液也影响卵母细胞的核成熟和发育^[16]。因此不同批次制备的卵泡液对猪卵母细胞成熟效果也可能不稳定,所以本试验使用来自于同一批制备的 pFF,发现母细胞的体外成熟系统中添加 10% 卵泡液对卵丘细胞的扩散、卵母细胞的成熟具有良好的作用。

猪卵母细胞的体外成熟与 COCs 的卵泡大小有关。卵巢上卵泡在体内正常的生理条件下,是卵母细胞发生、生长和最后成熟的微环境。卵泡的发育调节着卵母细胞的成熟,卵泡发育早期的卵母细胞不具备恢复减数分裂的能力。随着卵泡的发育,当其直径增加到一定大小时,卵母细胞才具备这种能力。根据相关研究,猪卵泡直径只有达到 2 mm 以上,其卵母细胞才具备体外成熟的能力,小卵泡中的卵母细胞缺乏进一步发育所需的相关因子^[17]。本试验结果显示,在猪卵母细胞体外成熟中,卵泡直径 3~6 mm 和大于 6 mm 的卵泡获得的 COCs 体外培养成熟率极显著高于卵泡直径在 3 mm 以下 COCs 的成熟率,大卵泡与中等卵泡获得的卵母细胞体外成熟率无显著差异;小卵泡获得的卵母细胞体外成熟率较低,不适合于体外成熟培养。

对不同分级的猪卵母细胞体外培养,A 级与 B 级成熟率无显著差异,但明显高于 C 级,说明 COCs 中卵丘层对卵母细胞成熟有明显影响,A 级与 B 级卵母细胞更适合体外培养,且成熟率更高。有研究报道,猪卵母细胞的体外成熟伴随卵丘细胞的扩散,扩散的卵丘细胞能够调节诸如氨基酸、核苷酸、磷脂酸、激素、蛋白质等物质在卵母细胞内外的进出,诱导卵母细胞排出有害因子,从而有效地抑制卵母细胞的退化^[18-19]。卵母细胞在生长发育中所释放的生长因子对卵丘细胞的生长也有一定的促进作用,卵母细胞与卵丘细胞的这种相互作用使得两者共同发育生长,最终促进了卵母细胞的成熟。

参 考 文 献

- [1] LEE M S, KANG S K, LEE B C, et al. The beneficial effects of insulin and metformin on *in vitro* developmental potential of porcine oocytes and embryos[J]. *Biology of Reproduction*, 2005, 73(6): 1264-1268.
- [2] ONISHI A, IWAMOTO M, AKITA T, et al. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei[J]. *Science*, 2000, 289: 1188-1190.
- [3] POLEJAEVA I A, CHEN S H, VAUGHT T D, et al. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells[J]. *Nature*, 2000, 407: 86-90.
- [4] NIEMANN H, RATH D, WRENZYCKI C. Advances in biotechnology: new tools in future pig production for agriculture and biomedicine[J]. *Reprod Domest Anim*, 2003, 38(2): 82-89.
- [5] 霍道坦, 陶勇, 王勇, 等. 猪胎儿卵母细胞发生早期的细胞凋亡变化[J]. *华中农业大学学报*, 2010, 29(1): 71-74.
- [6] KRISHER R L, BRAD A M, HERRICK J R, et al. Comparative analysis of metabolism and viability in porcine oocytes during *in vitro* maturation[J]. *Animal Reproduction Science*, 2007, 98(1): 72-96.
- [7] PETERS R M, WELLS K D. Culture of pig embryos [J]. *J Reprod Fertil Suppl*, 1993, 48: 61-73.
- [8] TALBOT P, DICARLANTONIO G. Ultrastructure of opossum oocyte investing coats and their sensitivity to trypsin and hyaluronidase [J]. *Dev Biol*, 1984, 103(1): 159-167.
- [9] FUNAHASHI H, DAY B N. Advances in *in vitro* production of pig embryos [J]. *Reprod Fertil Suppl*, 1997, 52: 271-283.
- [10] 张运海. 利用体细胞核移植技术生产猪克隆胚胎的研究[D]. 北京: 中国农业大学生命科学学院, 2006.
- [11] 王海, 曾申明, 朱士恩, 等. 培养介质、卵丘细胞和卵泡直径对猪卵母细胞体外成熟的影响[J]. *中国畜牧杂志*, 2002, 38(5): 15-17.
- [12] 徐小明, 杨春荣, 胡军和, 等. 猪卵母细胞体外成熟及电激活后发育能力的研究[J]. *自然科学进展*, 2006, 16(3): 361-364.
- [13] DELOS-REYES M, LAPIERRE L, SAENZ L, et al. Effect of the length of the hormonal supplementation on *in vitro* maturation of porcine oocytes[J]. *Theriogenology*, 2001, 55(1): 468-469.
- [14] YOON K W, SHIN T Y, PARK J I, et al. Development of porcine oocytes from preovulatory follicles of different sizes after maturation in media supplemented with follicular fluids[J]. *Reprod Fertil Dev*, 2000, 12(4): 133-139.
- [15] TATEMOTO H, MUTO N, SUNAGAWA I, et al. Protection of porcine oocytes against cell damage caused by oxidative stress during *in vitro* maturation: role of superoxide dismutase activity in porcine follicular fluid[J]. *Biol Reprod*, 2004, 71: 1150-1157.
- [16] ITO M, IWATA H, KITAGAWA M, et al. Effect of follicular fluid collected from various diameter follicles on the progression of nuclear maturation and developmental competence of pig oocytes[J]. *Animal Reproduction Science*, 2008, 106(4): 421-430.
- [17] YOON K W, SHIN T Y, PARK J I, et al. Development of porcine oocytes from preovulatory follicles of different sizes after maturation in media supplemented with follicular fluids[J]. *Reprod Fertil Dev*, 2000, 12(4): 133-139.
- [18] ZHANG X, MIAO Y L, ZHAO J G, et al. Porcine oocytes denuded prior to maturation can develop the to the blastocyst

stage if provided a cumulus cell-derived co-culture system[J].

Journal of Animal Science, 2010, 88: 2604-2610.

[19] JEZOVÁ M, SCSUKOVÁ S, NAGYOVÁ E, et al. Effect of in-

traovarian factors on porcine follicular cells: cumulus expansion, granulosa and cumulus cell progesterone production [J].

Anim Reprod Sci, 2001, 65(1/2): 115-126.

Effect factors of porcine oocytes *in vitro* maturation

HUA Zai-dong¹ ZHENG Xin-min² WEI Qing-xin² XU Hou-qiang¹ LIU Xi-mei² LI Li²

1. Guizhou Key Lab of Animal Genetics, Breeding and Reproduction/College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China;

2. Hubei Key Lab of Animal Embryo Engineering and Molecular Breeding/Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430064, China

Abstract In present study, porcine ovaries were obtained and aspirated. Cumulus-oocyte complexes were followed by *in vitro* culture until the presence of the first polar body (pb I). We investigated the effects of basic culture medium, hormone, follicle diameter, and oocytes wrapped cumulus cells on *in vitro* maturation of pig oocytes for establishing good *in vitro* culture system. The results showed that the mature rate of oocytes with mTCM199 was significantly higher than NCSU-23 ($P < 0.05$). Based on the results of experiment 1, the maturation rate of cumulus-oocyte complexes in maturation media with PMSG, hCG and pFF were 55.90%, 58.16%, and 51.50%, respectively, showing that the combined treatment group (80.63%) was significantly higher than those of single treatment groups. There were no significant differences in the maturation rates of the ovary follicles larger than 6 mm (76.43%) and 3-6 mm (83.33%) in diameter, but both were significantly higher than the ovary follicles less than 3 mm in diameter (30.94%, $P < 0.01$). The cumulus-oocyte complexes were divided into level A, B and C according to layer of cumulus cells, which were cultured *in vitro* matured for 44 h, the maturation rates of level A and B were not significant ($P > 0.05$), but the both were significantly higher than oocytes of level C ($P < 0.01$).

Key words porcine; oocytes; *in vitro* maturation; cumulus-oocyte complexes (COCs)

(责任编辑:边书京)