

影响绵羊卵母细胞体外成熟因素研究进展

陆会宁, 齐燕姣

(西北民族大学 生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730124)

摘要: 卵母细胞体外成熟培养技术是现代生物技术中的重要内容之一, 为提高绵羊卵母细胞的成熟质量和促进动物生物技术研究, 综述了绵羊卵母细胞体外成熟的主要影响因素, 主要包括季节因素和绵羊年龄、卵母细胞的来源、培养条件和方法、成熟培养液及其它添加成分等。

关键词: 绵羊; 卵母细胞; 体外成熟培养

中图分类号: S826

文献标识码: A

文章编号: 1002-2767(2013)09-0147-04

自从 1935 年发现兔卵母细胞脱离原来的卵泡环境后会在体外自发成熟以后, 科学家便模拟体内的生长环境来促使卵母细胞在体外成熟, 拉开了卵母细胞体外培养的序幕。截止到目前, 已经通过大量的试验对许多影响因素进行了分析和

研究, 并获得了有效的结果。卵母细胞的成熟质量影响着胚胎工程和体外受精等生物技术的成功与否, 如何改善卵母细胞体外成熟的质量是当前体外培养技术的一个热点。卵母细胞体外成熟是在许多因素作用下完成的, 当其中某个因素发生变化时都有可能影响卵母细胞的成熟质量。该文就影响绵羊卵母细胞体外成熟的主要因素: 季节因素、绵羊年龄、卵母细胞来源、培养条件和方法、成熟培养液及其添加成分等方面进行综述, 旨在为提高绵羊卵母细胞的成熟质量和动物生物技术的研究提供全面的理论依据。

收稿日期: 2013-04-20

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(31920130035)

第一作者简介: 陆会宁(1979-), 男, 甘肃省庆阳县人, 硕士, 从事动物卵母细胞体外培养和胚胎发育的研究。E-mail: lzz_316@163.com。

莓”, 扩大品牌市场占有率, 把品牌做大做强。由省质监局、农委牵头, 各相关市地县推进落实, 以保证黑龙江省蓝莓产业科学、持续地发展。

参考文献:

- [1] 任立新, 伊春市蓝莓产品质量存在的问题及建议[J]. 现代农业科技, 2012(7): 343.
- [2] 李丽敏, 吴林. 中国蓝莓产业发展研究[M]. 北京: 中国农业出版社, 2011: 109-117.
- [3] 李丹, 林琳. 越橘食品资源的开发与利用[J]. 食品与发酵工业, 2000(4): 76-81.

- [4] 李丽敏, 郝庆升. 中国蓝莓产业发展若干问题思考[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(20): 546-548.
- [5] 李亚东, 刘广海, 张志东. 中国蓝莓产业现状和发展趋势[J]. 中国果树, 2008, 11(6): 67-71.
- [6] 张泽一, 王春才. 产业政策强度对产业发展影响的模型分析[J]. 技术经济与管理研究, 2009(3): 10-13.
- [7] 吴兴壮, 李利峰. 越橘果实资源的开发利用现状及前景预测[J]. 辽宁农业科学, 2003(6): 23-24.
- [8] 郑学益. 构筑产业链, 形成核心竞争力[J]. 福建改革, 2000(8): 14-15.

Research Status of Blueberry Processing in Heilongjiang Province

ZHANG Li-li

(Institute of Berry in Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Suiling, Heilongjiang 152200)

Abstract: In order to promote the development of blueberry industry better in Heilongjiang province and further improve the blueberry processing products in the market, products market share, brand, quantity and popularity of blueberry processed products in Heilongjiang province were investigated including beverage, fruit wine and blueberries dairy products, the processing industry present situation of processing enterprises, the condition of product quality were analyzed, and the corresponding countermeasures and suggestions were proposed to make leading enterprises, strengthen product development and improve the quality guarantee system.

Key words: blueberry; processing; present status; countermeasures

1 季节因素和绵羊年龄

1.1 季节因素

绵羊是季节性发情动物,季节因素对卵母细胞的影响主要表现在采集卵母细胞个数多少和成熟质量方面。发情季节采集的绵羊卵母细胞数多于乏情季节,体外成熟率也显著高于乏情季节,这一点与许多报道的研究结果一致^[1]。其主要原因是绵羊为季节性发情动物,在发情季节有大量的卵泡生长,并且卵泡内的FSH、LH和E₂高于乏情季节,这对卵母细胞的体外成熟培养有积极的影响作用。

1.2 绵羊年龄

对性成熟前绵羊与成年绵羊卵母细胞成熟研究表明,年龄对卵母细胞体外成熟率影响无显著差异,这与O'Brien等的研究结果一致,但其胞质成熟是否存在差异还有待进一步研究^[2]。对性成熟前绵羊与成年绵羊卵母细胞体外受精后发育潜力研究发现,囊胚发育率成年绵羊极显著高于性成熟前绵羊^[3],其原因有待进一步研究。

2 卵母细胞来源

2.1 卵巢的贮存时间和温度

从屠宰场采集卵巢到运回实验室取卵培养,一般最佳时间间隔为1~4 h,卵巢在体外保存温度一般为20~25℃,在这个温度下保存对卵母细胞的体外成熟无明显影响。在4~10℃时则会显著降低卵母细胞成熟的质量,这对卵母细胞来说是一个低温刺激,卵母细胞会发生冷休克,对卵母细胞发育产生明显的有害影响。朱士恩在研究不同温度保存的卵巢对绵羊卵母细胞发育能力的影响中得到了相同的结论^[4]。

2.2 卵母细胞的采集方法

目前常用的方法是抽吸法和剖切法,试验利用这两种采集方法采集绵羊卵巢卵母细胞进行体外成熟培养,对其效果进行了对比研究。结果表明:剖切法获得的卵子数显著高于抽吸法,而所用时间则无显著差异,获取的优质卵母细胞的比例在剖切法中显著高于抽吸法,剖切法中卵丘扩散率和第一极体排出率要显著高于抽吸法,因此采集绵羊卵母细胞多用剖切法。

2.3 卵泡的大小

卵泡的大小对卵母细胞的成熟和发育能力影响比较大,经过对来自不同直径卵泡的绵羊卵母细胞进行体外成熟研究,大于3 mm的卵泡的卵

母细胞成熟率显著高于直径低于1 mm卵泡的卵母细胞,因为只有当卵泡直径达到3 mm以后,卵母细胞才具备体外成熟的能力,才能保证完成细胞核的最后成熟和向细胞质中贮存RNA、蛋白质及其它因子。

2.4 细胞的类型和形态

大量试验结果表明,A级和B级卵母细胞具有较高的成熟率和胚胎卵裂率。裸露卵母细胞或卵丘细胞很少的绵羊卵母细胞,成熟率为30%左右,A级和B级卵母细胞成熟率达70%以上,这说明卵丘细胞的多少对卵母细胞体外成熟有影响,其原因在于卵母细胞体表比要比其它细胞大的多,单凭简单的物质扩散无法将其营养物质供应给卵母细胞,必须借助外层的卵丘细胞以及它们之间的联结完成能量供应。

3 培养方法和条件

卵母细胞体外成熟培养多采用四孔板培养法,将50~60个卵母细胞放入含有500 μL的成熟培养液中,培养液至少在培养箱中平衡2~4 h,最好保证将卵母细胞均匀地分散在培养液滴中。培养温度对卵母细胞体外成熟的影响很大,在研究家畜卵母细胞体外成熟过程中,温度大都采用38.5℃的温度环境。用5% CO₂气相环境来维持培养液的酸碱度。绵羊卵母细胞在体外培养成熟时间为24 h,此时也是进行绵羊卵母体外受精的最佳时期。

4 成熟培养液及其添加成分

绵羊卵母细胞体外成熟培养体系目前以TCM-199的应用较为广泛,应用TCM-199对绵羊的卵母细胞进行体外培养,成熟率可达79%。通常在培养体系中添加血清、激素、卵泡液、抗氧化物质、维生素和生长因子及其它添加成分。

4.1 血清

在卵母细胞成熟中,血清为颗粒细胞提供营养,并防止透明带硬化。目前在体外成熟中常用的血清有胎牛血清、新生牛血清、发情牛血清和牛血清白蛋白。众多研究结果表明,胎牛血清优于牛血清白蛋白,而发情牛血清又优于胎牛血清。在使用胎牛血清和新生牛血清时,要求有较高浓度的激素,而在使用发情牛血清时需要的激素浓度较低或不需要激素。在绵羊卵母细胞成熟时用5%发情牛血清添加低浓度的激素,或是10%的胎牛血清中添加低浓度的激素就能满足需求,且

能提高成熟质量^[5]。发情牛血清中含有一定浓度的激素和促成熟因子,能促进卵母细胞的成熟,并且最容易获得。

4.2 激素

在卵母细胞体外成熟培养时,培养液中添加的激素主要为 FSH 或 LH 亦或是两者的混合物,并且证明这些激素可以促进卵母细胞的体外成熟。绵羊卵母细胞体外成熟所需的 FS 和 LH 激素浓度和绵羊所处的生理周期有密切关系,在发情季节里低浓度的 FSH 和 LH 可以提高卵母细胞的成熟率。关于雌激素对卵母细胞体外成熟的影响,多数学者认为 E_2 是促进胞质成熟的重要成分,它能促进卵母细胞成熟分裂的复始。关于激素对绵羊卵母细胞体外成熟影响的报道中,一般是同时添加适量的 FSH ($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), LH ($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和 E_2 ($1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 以促进卵母细胞质的成熟^[6]。

4.3 卵泡液

多数研究认为,在卵母细胞体外成熟液中添加卵泡液,能提高卵母细胞的成熟率,原因在于卵泡液是卵母细胞体外发育的介质,含有来自血清的生长因子和卵母细胞的分泌因子,能提高卵母细胞质成熟的质量,增加胚胎的发育能力。但是用于体外培养时会表现出对卵母细胞成熟的促进和抑制两种相反的作用,要通过控制卵泡液的添加浓度,清除其对卵母细胞成熟的抑制作用。孙风俊等在绵羊卵母细胞的体外成熟培养液中添加绵羊的卵泡液,提高了成熟率^[7]。

4.4 抗氧化物质

在卵母细胞体外成熟过程中,会产生对卵母细胞成熟和胚胎发育有害的 ROS,这是引起细胞死亡的一个重要原因。ROS 在细胞内的水平由过氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)等物质中介的代谢过程控制。添加谷氨酰胺(glutamine)有利于细胞充分利用那些终止或降低有害氧化反应的代谢途径。半胱氨酸是合成谷胱甘肽的前体物质,成熟液中添加半胱氨酸增加了成熟卵母细胞内谷胱甘肽的量,提高了卵母细胞及其随后胚胎的抗氧化能力,增强了卵母细胞的发育能力。在卵母细胞的成熟培养液中添加这些物质,能保护细胞免受 ROS 的侵害,研究结果表明添加 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 半胱氨酸能显著提高绵羊卵母细胞细胞核和细胞质的成熟能力^[8]。

4.5 生长因子

近年来研究生长因子对卵母细胞的成熟影响的报道比较多,研究较多的生长因子主要有上皮细胞生长因子(EGF)、转化生长因子(TGF)、胰岛素类生长因子 I(IGF-I)和血管内皮生长因子(VEGF)等,研究表明,生长因子对卵母细胞的成熟质量有一定的促进作用。

4.5.1 上皮细胞生长因子 刘丑生等人研究证明在培养液中添加 $10 \sim 40 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 EGF 对绵羊卵母细胞体外成熟无显著的影响,添加 $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 EGF 可以显著提高绵羊卵母细胞的体外成熟率和卵裂率^[9]。Lorenzo^[10] 等认为 EGF 作用在于促进卵母细胞的减数分裂使其成熟。Park^[11] 等研究证明 EGF 浓度低于 $30 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时对卵母细胞体外成熟没有作用。

4.5.2 转化生长因子 TGF 是一组具有生物活性的多肽类物质,这些多肽因子能诱发本来着壁依赖生长的正常细胞出现可逆性转化的表型以促进细胞生长,也能诱导指示细胞产生可逆转化。它主要分两大类: α 型 TGF 和 β 型 TGF,研究结果预示着 TGF α 改善了卵母细胞的成熟质量,能够提高卵母细胞受精后进一步的发育潜能。然而 TGF 对卵母细胞起作用的确切机制还不是完全清楚,它们通过相同的受体均促进了核的成熟转变和 α -微管蛋白的正常分布以及 CG 的迁移,与血清中某些成分相似,改善了卵母细胞成熟的质量,但这些还需进一步通过体外受精实验以及进一步的研究来阐明它们在卵母细胞成熟过程中的具体作用。

4.5.3 胰岛素类生长因子(IGF-I 和 IGF-II)

IGF-I 能增加葡萄糖和氨基酸的吸收,抑制蛋白质降解,刺激各种细胞的增殖和分化^[12]。刘丑生等人研究证明 IGF-I 对绵羊卵母细胞的成熟具有双向作用,低浓度的 IGF-I 对卵母细胞成熟具有促进作用,高浓度的 IGF-I 对卵母细胞的成熟有抑制作用,在成熟培养液中添加 $40 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 IGF-I 可以显著提高卵母细胞的成熟率和卵裂率。添加 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 IGF-I 时,成熟率和卵裂率显著降低^[9]。

4.5.4 血管内皮生长因子 VEGF 是一种促进内皮细胞增生、细胞迁徙、抑制细胞凋亡,提高血管和微血管对大分子物质通透性的生长因子。动物试验表明其作为血管形成最关键的始动因子,作用在早期的诱生阶段,诱导血管内皮细胞分裂

增生,形成未完全连接的不成熟、欠稳定的原始血管,通过血管生成素 1 和 ephrinB2 的协同作用使该血管重塑而成熟^[13]。VEGF 在哺乳动物生殖调控中也起着重要作用。在牛上的研究结果证明,在培养液中添加适量 VEGF 可以提高黑白花牛卵母细胞体外成熟率。在绵羊卵母细胞体外成熟培养液中添加 5 ng·mL⁻¹ 的 VEGF 能有效地促进卵母细胞成熟、体外受精和胚胎早期发育^[14]。但有关 VEGF 促进卵母细胞成熟以及胚胎体外发育的作用机理以及 VEGF 基因表达在不同生长时期的差异研究结果还有待于进行深入研究。

5 结论

有关绵羊卵母细胞体外培养研究的报道比较多,也取得了一定的成绩,但与体内成熟卵母细胞相比,体外成熟卵母细胞成熟质量还是比较差,体外受精的卵裂率和囊胚发育率显著低于体内。需要深入研究卵母细胞的成熟的调控机理和细胞质成熟质量等问题。在不久的将来,卵母细胞体外培养的成熟质量会接近体内成熟的质量,它必将进一步推进现代生物技术的发展,更好地为动物繁殖与育种和畜牧业发展服务。

参考文献:

- [1] 李辉,张居民. 季节效应对绵羊体外受精的影响[J]. 云南畜牧兽医学报,2004(4):25-26.
- [2] O'Brien J K, Catt S L, Ireland K A, et al. In vitro and in vivo developmental capacity of oocytes from prepubertal and adult sheep[J]. Theriogenology, 1997, 47: 1433-1443.
- [3] Rizos D, Burke, Duffy P, et al. Comparisons between nulliparous Heifers and COWS as oocyte donors for embryo production in vitro[J]. Theriogenology, 2005, 63: 939-949.
- [4] 卫恒习, 田树军, 朱士恩, 等. 提高绵羊卵母细胞发育能力的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2005(5): 34-36.
- [5] 文国艺, 卢克焕. 颗粒细胞制备单层细胞时其浓度对牛早期胚胎体外发育的影响[J]. 中国兽医学报, 1994(2): 185-187.
- [6] 熊焰成, 苏雷. 哺乳动物卵母细胞体外成熟培养的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2007(1): 71-74.
- [7] 孙凤俊, Holm P. 人及绵羊卵泡液对绵羊卵母细胞体外成熟受精及发育的影响[J]. 中国畜牧杂志, 1994(1): 20-22.
- [8] 郭洪, 万鹏程, 石国庆. 成熟液添加半胱胺对羔羊卵母细胞体外成熟、受精和发育的影响[C]//中国畜牧兽医学会动物繁殖学分会. 中国畜牧兽医学会动物繁殖学分会第十六届学术研讨会论文集. 哈尔滨: 中国畜牧兽医学会动物繁殖学分会, 2012.
- [9] 刘丑生, 陆会宁, 张利平, 等. EGF 和 IGF-I 对绵羊卵母细胞体外成熟和卵裂的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39(5): 588-593.
- [10] Lorenzo P L, Illera M J. Enhancement of cumulu expansion and unclar maturation during bovine oocyte maturation on in vitro by the addition of ep idermal growth factor and insulin like growth factor[J]. Reprod Fertil, 1994, 101(3): 697-701.
- [11] Park KW. Exposure of bovine oocyte to EGF during maturation allowsthem to develop to blastocysts in a chemically-defined medium[J]. Theriogenology, 1997, 48: 1127-1135.
- [12] 赵海波, 罗丽兰, 刘义. 胰岛素样生长因子-1 对卵母细胞成熟度、受精力及卵裂力的影响[J]. 中华妇产科杂志, 1997, 32: 586-588.
- [13] Rail Einspanier. Express of the vascular endothelial growth factor and its receptors and effects of VEGF during in vitro maturation of bovine cumulus-oocytecom-plexs[J]. Mol Rep and Dev, 2002, 62: 29-36.
- [14] 曹忻, 罗海玲, 石国庆, 等. 血管内皮生长因子对绵羊卵母细胞体外受精及胚胎发育的影响[J]. 甘肃农业大学学报, 2008(4): 27-31.

Research Progresses on the Factors Influencing Maturation *in vitro* of Sheep Oocyte

LU Hui-ning, QI Yan-jiao

(College of Life Science and Engineering, Northwest University for Nationalities, Lanzhou, Gansu 730124)

Abstract: Oocyte maturation culture technology *in vitro* played an important role in modern biotechnology. In order to improve the quality of sheep oocytes maturation and promote research of animal biotechnology, main influencing factors of oocyte maturation *in vitro* had been reviewed including season factors, sheep age, source of oocytes, culture conditions, methods, culture medium, adding substances and so on.

Key words: sheep; oocyte ; maturation *in vitro*