

牛体外受精技术研究进展

黄志坚 黄依明 福建农林大学动科院 350002

牛体外受精技术 (In vitro fertilization, IVF) 包括有卵母细胞的体外成熟、精子获能、体外受精和早期胚胎的体外培养体系等几个连续过程。自从 1982 年美国科学家 Brackett 等获得第一胎试管婴儿以来,体外受精技术迅猛发展。我国与国外相比起步较晚,但发展迅速,1989 年 8 月,首例试管牛在内蒙古大学诞生,同年,冷冻体外受精胚胎培育成试管牛在江苏农科院诞生,1990 年,利用冷冻体外受精胚胎技术在中国农科院获得 3 只试管牛等可喜的进展。体外受精技术不仅为家畜胚胎生物工程提供大量廉价的胚胎来源,同时,也是研究配子细胞发生、发育规律的有效手段,其进一步发展也将为胚胎在体外全程工厂化生产提供可能。本文就牛体外受精技术的研究进展作简要综述。

1 卵母细胞的体外成熟 1.1 卵母细胞的获取

自卵巢获取卵母细胞的方法主要有 4 种。机械分离法,系自屠宰场废弃的卵巢表面获取卵母细胞的常用方法,主要有抽吸法、切割法和剥离法。抽吸法操作迅速,但易损伤卵丘细胞,取卵数量较少;切割法在最短时间内获卵数量较多,但易出现裸卵和损伤卵丘细胞;剥离法操作繁琐,但对卵丘细胞损伤较小。机械分离和酶消化结合法,系自屠宰场废弃的卵巢内获取卵母细胞的常用方法,可克服机械分离时间长期的特点,又减轻了酶消化过程中对细胞细微结构的破坏。腹腔镜和超声扫描活体取卵法,系自活体卵巢内获取卵母细胞的常用方法,取卵数量多,母畜可持续利用,但操作方法复杂,且受条件限制。

哺乳动物卵巢中有腔卵泡细胞所占比例很少,绝大多数是属于腔前卵泡。随着胚胎体外生产技术的发展,对卵母细胞需求量日益增多,如何建立腔前卵泡的培养体系,最大限度获取大量的具有成熟和受精能力的卵母细胞,将极大地促进体外受精等胚胎工程技术的应用和发展。腔前卵泡的分离方法有:机械分离法、胶原酶消化直接分离法、酶消化振荡分离法和酶消化-机械分离法,后者以回收腔前卵泡最多,故常用于啮齿动物、猪和牛等动物的卵巢中腔前卵泡的分离。

1.2 卵母细胞的体外成熟培养系统 卵母细胞体外成熟培养系统的建立是按照母体要求模拟的,如依照输卵管液和子宫液成分而定,这样可为卵母细胞创造一个与母体相似的体外营养环境,以利细胞生长发育。 1.2.1 基础培养体系:以合成培养液如 TCM199 应用最多,牛、猪等卵母细胞应用这种培养液的体外成熟率均达到 80% 以上。它的缓冲体系以 Hepes 或磷酸氢盐缓冲系 (Earle's Salts) 为好,而磷酸盐缓冲

系 (Hank's) 较差。培养条件是 5% CO₂、95% 空气和饱和湿度,多采用微滴法 (100μl, 10~15 个卵母细胞) 培养。

在基础培养液中添加其它成分可提高卵母细胞的体外成熟率。不同研究者目前常添加成分也不同。

在基础培养液中添加犊牛血清、发情牛血清、胎牛血清、发情山羊血清或牛血清白蛋白 (BSA) 等,血清中可能含某种促进卵母细胞成熟和在体外受精的成分,可阻止透明带硬化和促进受精发生。在实践中,血清适宜的使用浓度为 5%~10%, BSA 浓度为 3~5mg/mL。

在基础培养液中添加促性腺激素,主要有 HCG 或 PMSG、FSH + LH。促性腺激素能诱发卵丘细胞扩展、增加达到 M II 期的成熟率,并有促进卵裂的作用。添加雌激素对卵母细胞体外成熟的影响,尚存在分歧。多数学者认为雌二醇对卵母细胞完全成熟是有帮助的,可显著提高受精后胚胎的发育率。但在添加发情牛血清、发情山羊血清时,雌二醇对卵母细胞体外成熟和胚胎发育并不重要。以添加发情牛血清取代促性腺激素和雌激素,同样可使牛卵母细胞成熟率达 90% 以上,因而主张无激素培养法。

此外,基础培养液中添加卵泡液 (BFF)、颗粒细胞或牛输卵管上皮细胞利于卵母细胞体外成熟。(转下页)

(接上页)擦,每天早晚各 1 次,连用 1 周为 1 个疗程。7 天后复查皮屑痂皮和折断的毛发,除发现死的痒螨外,已不再发现活的痒螨。熊猫腹部原已脱毛的两处病灶,重新长出新的细毛,2 个月后已完全恢复正常。

2 讨论 2.1 痒螨是牛、羊、马和野生动物被毛上常见的体表寄生虫。寄生在不同寄主身上的痒螨,虽然形态、大小十分相似,但对各自的寄主有明显的偏嗜性,很难将一种寄主身上的痒螨移居在另一寄主身上寄生。痒螨虽可在不同寄主皮肤造成损害,但远不如疥螨或蠕螨所致的皮肤病严重。如痒螨数量不多、皮肤抵抗力强、机体免疫功能高,一般不会造成皮肤病变,所以将痒螨称为共生螨类。熊猫痒螨虫的传播方式,主要是通过直接接触传染,如将感染熊猫和健康熊猫混合一起饲养,则极易造成相互感染。痒螨虫的繁殖旺季,一般在温暖潮湿的春末和秋初,这时如将熊猫饲养在阴暗潮湿、阳光照射不足,兽舍环境拥挤,痒螨虫易大量繁殖危害熊猫。熊猫痒螨病的预防,关键在于对病熊猫的彻底隔离和治疗,对兽舍地板常用火焰或每月至少 2 次用 10% 烟叶硫磺溶液消毒。

2.2 10% 硫磺软膏对局部严重感染的病灶有良好疗效,但对全身性驱螨应另选药物,并在治疗前进行治疗效果和安全性实验。

致谢:本文得到福建省寄生虫病防治研究所林金祥老师的指导,在此表示感谢。

(接上页) 腔前卵泡体外成熟培养系统: 培养腔前卵泡培养基主要有 MEM、GMEM、TCM199 和 Waymouth MB752/1 培养基等。培养基中添加血清、成熟分裂抑制剂 (如 cAMP 及其类似物、次黄嘌呤和 3-异丁基-1-甲基-黄嘌呤 3-IBMX)、促性腺激素、类固醇激素和生长因子 (如胰岛样生长因子 IGF、血管表皮生长因子 VEGF、转化生长因子 TGF β 、神经生长因子 NGF 和成纤维细胞生长因子 FGF) 等。培养方法有微滴法、琼脂包埋培养法、胶原蛋白铺层培养法 (二维法) 和胶原蛋白包埋培养法 (三维法)。分离培养腔前卵泡研究已在小鼠、仓鼠、大鼠、兔、猫、猪和牛均有报道, 并以小鼠和牛研究较多, 但仅在小鼠获得后代 (Epping et al, 1989)。

1.2.2 体外成熟的判定: 卵母细胞成熟是一个复杂生物学过程, 包括有细胞质、细胞核、细胞膜、卵丘细胞和透明带的成熟。检测培养的卵母细胞是否成熟, 方法之一一是解剖显微镜下观察卵丘细胞是否扩展松散。扩展好的, 一般认为是已成熟的卵母细胞。方法之二是用吸管吹打法或透明质酸酶分解法除去卵丘细胞, 以观察在卵周隙中是否有第一极体, 但要观察第 II 次减数分裂 (M II) 中期的核, 需制片染色。

1.2.3 影响卵母细胞体外成熟的因素: ①动物的种类不同, 在相同培养条件下, 达到同样发育阶段, 其培养时间则不同: 如牛 18~24h、山羊 24~25h、绵羊 24~26h、猪 42~48h; 培养温度也不同, 黄牛、奶牛和猪 39℃, 水牛 37.5℃, 山羊和绵羊 24~26℃。动物的种类不同, 卵母细胞体外成熟的表现也不同, 其根本原因是卵母细胞自身结构 (包括卵丘细胞的多少、卵质内细胞器的分布和数量、核基因、膜的成熟状态) 的不同。②卵母细胞类型: 在培养前必须进行以卵母细胞周围的卵丘细胞情况进行质量筛选和分级划分。卵丘细胞不仅可识别优劣卵, 且与卵母细胞体外成熟密切相关。卵丘细胞能分泌减数分裂激活物 (meiosis-activating substance, MAS) MAS 能诱发牛卵母细胞的核由休止期进入成熟分裂期。按卵丘细胞的层数及形态将卵母细胞大致分 5 类, 即无卵丘细胞; 有 2~3 层的卵丘细胞; 4~5 层的卵丘细胞; 6 层以上卵丘细胞和卵母细胞外周为较厚的胶状物包裹。经体外成熟培养并受精后, 其卵裂率分别为 48.8%、70.9%、84.4%、82.1% 和 68.2%, 囊胚发育率分别为 0.0%、17.8%、33.3%、54.6% 和 25.0% (杨膺白等, 1994)。③卵泡直径与卵母细胞体外成熟能力有关: 牛直径为 2~8mm 卵泡中卵母细胞经体外成熟和体外受精, 卵裂率 (60.9% 对 37.0%) 和受精卵的囊胚发育率 (56.0% 对 38.0%) 明显高于直径小于 2mm 卵泡中的卵母细胞。这种卵母细胞受精后, 大多数停留在 8-细胞期之前 (曾申明等, 2000)。水牛以 2~

5mm 卵泡者的体外成熟率和受精率较高 (江金益等, 1990)。④卵母细胞离体操作的时间和条件: 牛卵巢离体保存温度最好控制在 25~37℃, 一般要求在 1~4h 最多不超过 8h 应取卵培养, 否则会降低卵母细胞的体外成熟率和受精率。也有研究表明卵巢离体保存温度不应低于 30℃, 否则卵母细胞发育很难越过 M II 期, 这可能是卵子纺锤体结构受到破坏。

此外, 还与采卵季节有关, 一般认为在繁殖季节或气候适宜季节获得的卵泡卵母细胞体外成熟率较高。

2 精子获能和体外受精 哺乳动物精子在受精前须经一系列变化, 才能获得使卵子受精的能力, 这称为精子获能。获能是哺乳动物精子受精时独具的特征, 是多时相、多步骤、有时序的复杂过程, 一般有两个显著的变化, 一是脱去精子表面的某些大分子物质和去能因子的过程, 它是一个可逆的生理学变化; 二是诱发顶体反应, 它是一个不可逆的结构变化过程。获能方法有体内获能和体外获能。体外获能是体外受精的一个关键性技术环节, 主要包括精子的洗净、稀释和经培养使之获能和发生顶体反应。2.1 精子获能体系的建立 精子体外获能的方法主要有: 肝素处理法、钙离子载体 (Ionophore A23187, IA) 处理法、高离子强度液 (HIS) 处理法、高 pH 值处理法、咖啡因处理法以及添加牛卵泡液 (BFF)、猪卵泡液 (PFF)、子宫液、输卵管液、精子活力激活剂 (青霉素、肾上腺素、亚牛磺酸 hypotaurine)、黄嘌呤 (xanthine) 等。

Ohiphant 和 Brackett (1975) 首次报道应用 HIS 使兔精子获能获得试管兔, 并该培养液称为 BO 液或 DM 液, 后来应用该液还获得试管牛。

First 和 Parrish (1985) 在牛输卵管液中发现精子体内获能的活性物质是氨基多糖 (Glycosaminoglycans, GAGs)。体外试验证明, GAGs 能诱导牛、兔、人精子体外获能和顶体反应, 不同类型的 GAGs 对精子获能的作用程度不同, 依赖于其硫酸化程度。肝素是硫酸化程度很高的 GAGs, 对精子体外获能的作用很强。肝素已用于牛、绵羊、马、猪精子的获能。一般使用肝素浓度为 10~30 μ g/mL, 处理时间 10~15min。

Ca²⁺ 在精子顶体反应的诱发中起重要作用。钙离子载体在于能与 Ca²⁺ 形成复合物, 携带 Ca²⁺ 进入精子, 从而诱发顶体反应。IA 处理牛精子的优化条件是: 浓度为 0.1 μ mol/L, 作用时间为 0.5~1min。用钙离子载体处理牛、绵羊、山羊等动物精子, 能较快诱发精子的超活化运动和顶体反应, 使受精卵的分裂率提高, 并减少了多精入卵的现象。

用肝素或钙离子载体处理精子时添加咖啡因 (一般浓度为 2.5~5.0mmol/L) 能提高精子获能的效果。

此外,几乎在各种动物的精子获能中均以牛血清白蛋白(BSA)作为辅助成分,BSA可能改变精子的胆固醇含量,调整精子的脂肪水平,从而改变精子膜的稳定性。精子一旦获能,BSA可促进其迅速穿透卵子。

2.2 获能精子的判定 获能精子的快速检测方法一直是人们研究热点。建立简便高效的检测方法,免去繁琐的受精试验,将会大大加快精子体外获能研究进程。目前主要采用观察精子运动形式来确定精子是否获能。精子开始获能时,运动非常活跃,尾部振幅大而有力,获能后精子即出现超活化现象,表现为头部侧向曲线运动,鞭打幅度加宽,不同动物尾部运动有不同。

2.3 体外受精 先把精子用精子洗涤液离心洗涤两次,加入精子获能液,调整精子浓度,制成小滴,覆盖石蜡油,经培养30~60min。将体外培养成熟的卵母细胞加入与之共孵育。精卵共孵育时间与受精体系有关,BO液中需6~8h,而TALP(改良的Tyrode's乳糖溶液)中则需18~24h。洗去多余的精子和卵丘细胞,转移至受精卵培养液中继续培养。受精卵的标志是可见雌、雄原核,并排出第二极体,或已发育到卵裂期胚胎。

新型的体外受精技术是显微受精(microfertilization)。它是利用显微操作仪将精子直接注入卵母细胞内,使精卵结合的生命过程,已在小鼠、兔、牛和人类取得成功并获得后代。这项技术比常规体外受精的优势在于精子并不要求有活力。但对卵母细胞损伤、受精率不高、技术操作繁琐还有待进一步提高。

2.4 影响体外受精的因素 精子获能没有种的特异性,只要精子获能不影响其受精效果,而影响体外受精的因素包括卵母细胞的来源和成熟状态、精子来源和密度、精子的活力、培养基的选择、受精滴的大小、精卵比例、精卵相互作用时间、湿度、温度和气相等方面。

精卵比例:受精时精子密度和单位卵精子数,是影响体外受精效果的重要因素。动物种类不同而有差异,一般牛受精的精子密度是 $(2\sim4)\times 10^6$ 个/ml,单位卵精子数是3000~4000个/卵。高浓度的精子与卵子相遇,若精子获能率不高,就不会发生多精入卵。但随着卵母细胞成熟时间延长,多精入卵率随之增高。如何控制精卵相互作用时间是体外受精技术值得探讨的问题。

精子的来源:用同样获能处理的冷精、鲜精用于体外受精,卵子受精率和受精卵发育率,鲜精高于冻精,这与冷冻中产生的精子受冻害有关(旭日干等,1989)。

培养基成分:受精液中含有牛血清白蛋白(0.6%)的卵母细胞受精后,分裂率显著地高于无牛血清白蛋白组(84%对72%)(陈鸿冰等,1994)。

3 早期胚胎的体外培养体系 3.1 发育阻滞现象 体外受精胚胎在继续发育过程中存在着阻滞现象

(block of development),如小鼠为2细胞期,牛、羊为8细胞期,猪为4细胞期,这一时期胚胎的转录活性增强,在体外条件下胚胎基因的表达受到抑制。发育阻滞现象影响体外受精技术的发展和运用,如何克服这现象,将体外受精卵培养成具有活力的可操作的桑椹胚或囊胚,一直成为胚胎体外培养的研究热点。

3.2 体外培养体系 合成液培养系统:利用成分确定的合成液,添加血清、BSA、维生素和氨基酸(谷氨酰胺、牛磺酸 taurine、亚牛磺酸和甘氨酸等)、丙酮酸钠等物质。由于成分确定,便于研究发育过程中某一种物质对胚胎的作用机制,有助于了解胚胎早期发育和代谢机理,但囊胚发育率不高。最近又报道一种新合成液培养方法,即分步培养。根据胚胎发育不同生长阶段对不同物质和代谢不同,采用不同培养液进行培养,包括含血清和/或BSA的蛋白培养体系和无蛋白培养体系。据报道,屠宰场收集的牛卵母细胞经体外培养至成熟,尔后体外受精得到受精卵采用半确定培养液两步培养系统,其桑椹胚发育率高达50%(王红等,2000)。

共同培养系统:利用辅助细胞或饲养细胞(主要有输卵管上皮细胞、颗粒/卵丘细胞、子宫内膜细胞、肾细胞、成纤维细胞和水牛、大鼠肝细胞BRL等)在体外与受精卵共同培养,促进胚胎发育,获得较高的囊胚发育率。其作用可能是体细胞可产生促生长因子,可去除或代谢培养液中胚胎毒性因子,其分泌物可促进胚胎细胞的分化。但共同培养中仍存在选择何种体细胞最适宜,是否存在特异性或非特异性胚胎生长因子等。由于体细胞的加入,使培养液成分更加复杂。很难从中分析出影响培养效果的具体因素,而且胚胎和体细胞对培养的各种条件要求不一,故尚未有令人满意的结果。

由于发育阻滞现象可能是由于胚胎在该阶段对外界条件特别敏感,故改善培养液成分及培养条件如在培养液添加生长因子(李兵兵等,1994)、营养物质如丙酮酸和乳酸、牛磺酸和亚牛磺酸等、无机盐离子浓度(王武陵等,1994)、不同血清种类(卢晟盛等,1994)等将有利于胚胎通过体外发育阻滞。

4 展望 尽管牛体外受精技术的各个环节上仍有许多问题需要改进提高,但利用牛体外受精技术生产体外胚胎的应用前景十分广阔,对生物工程如胚胎的显微操作、核移植、转基因、性别鉴定和克隆动物等进一步开展,具有很大的价值。牛体外受精技术是对优良公母畜的综合利用,这对牛的育种意义更大,加上活体取卵技术、显微受精技术的应用,建立MOET(超数排卵和胚胎移植)育种体系,可迅速加快遗传进展,提高牛的生产力,便于品种国际间交流与运输,同时,对打破时间和空间的限制,控制疾病传播均产生深远意义。