

猪卵母细胞体外成熟过程中的减数分裂进程

黄雅琼^{1,2} 石德顺^{1*} 张晓溪¹ 张 顺¹ 陈旭健² 李家洲²

曾诗媛² 阮桂文² 赵仕花² 谭世俭¹

(¹广西大学动物繁殖研究所, 南宁 530005; ²玉林师范学院, 玉林 537000)

摘要 本研究主要探讨猪卵母细胞体外成熟过程中的减数分裂进程和卵母细胞的发育潜力。直径>2 mm的卵泡内的卵母细胞体外培养16 h, 大部分发生生发泡破裂(germinal vesicle breakdown, GVBD), 卵母细胞GV期的比率由0 h的68.00%下降到16 h的15.38%。成熟培养20 h时, 终变期(diakinesis, DK)的比率达到峰值(27.06%), 而MI的峰值(69.66%)出现在培养后28 h; 成熟培养32~44 h时, Ana-I/Tel-I期的比率达到最高(53.33%); 成熟培养48 h时, MII期的比率达到最大值(63.64%)。直径<2 mm、2~6 mm和>6 mm卵泡的卵母细胞体外成熟培养48 h的成熟率(排出第一极体, PB1)分别为5.12%、66.62%和46.71%; 孤雌激活后的分裂率分别为2.86%、72.11%和58.69%; 囊胚率分别为0、28.62%和23.46%。直径<2 mm和>6 mm卵泡的卵母细胞的卵裂率明显低于直径2~6 mm卵泡的卵母细胞的卵裂率($P<0.05$); 卵泡直径2~6 mm组和卵泡直径>6 mm组的囊胚率没有显著差异($P>0.05$)。研究结果将为猪卵子的核成熟进程和控制减数分裂的研究提供理论依据。

关键词 猪; 卵母细胞; 减数分裂; 体外成熟

家畜卵母细胞的体外成熟培养不仅可为家畜胚胎生物技术提供大量廉价的卵源, 同时也是研究卵母细胞发生和发育规律的有效手段。卵母细胞体外成熟研究对动物胚胎工程的研究与发展起着重要的作用。随着家畜细胞核移植、转基因和胚胎干细胞等技术的发展, 对卵子质量的要求越来越高, 卵子的质量是体外成熟培养技术体系的关键因素之一。自Pincus等(1935)^[1]发现牛卵母细胞可在体外恢复减数分裂现象以来, 从废弃的卵巢中采集卵母细胞并在体外培养已经成为研究胚胎生物技术的重要环节。然而, 由于卵母细胞发育成熟是一个极其复杂的过程, 受卵泡内外环境许多因素的影响, 同时其产生、发育和成熟的分子机制尚不十分清楚, 加上体外培养系统尚不完善, 导致卵母细胞的体外成熟质量不高, 进而制约胚胎工程技术的研究与应用。因此, 探究猪卵母细胞的胞质和核成熟不同步的问题, 着重研究猪卵母细胞成熟机制与核发育进程的规律, 将有助于进一步了解卵母细胞的发育潜能和成熟机制, 为弄清卵母细胞发育的影响因素并为提高猪卵母细胞的质量打下基础。本研究采用屠宰场回收的猪卵巢为实验材料, 对卵巢表面不同直径卵泡内的猪卵母细胞减数分裂进程进行研究, 以期进一步了解减数分裂中核发育的机制, 完善猪卵母细胞体外成熟的技术体系, 为哺乳动物胚胎工程研究工作的进一步开展打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

从南宁市屠宰场采集青年母猪的卵巢, 置于含有 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和抗生素(青、链霉素)的37℃生理盐水的保温瓶中, 2~3 h内尽快送至实验室。

1.2 方法

1.2.1 卵母细胞的采集 对采集的卵巢修整, 测量其表面可见部分的卵泡直径, 将其分成三组: 直径<2 mm, 直径2~6 mm和直径>6 mm, 抽取卵巢表面不同大小卵泡的卵泡液和卵母细胞, 收集卵泡液于锥形量筒内, 放置于 CO_2 培养箱中10 min后取出, 弃去上层卵泡液。稀释沉淀并在体视显微镜下挑选完整卵丘细胞层和部分致密卵丘细胞的卵母细胞(卵丘卵母细胞复合体), 用洗卵液[洗卵液: TCM-199+5.0 mmol/L $NaHCO_3$ +5 mmol/L HEPES+2%发情牛血清(OCS)]洗净干净。整个捡卵过程保持38℃。

1.2.2 卵母细胞的成熟 清洗干净的卵母细胞放入1 ml的含有FSH激素0.1 $\mu g/ml$ 促卵泡素(follicle stimulating hormone, FSH)的成熟培养液(无血清的TCM-199基础液+10% PFF+0.1% mg/ml Cys)的玻

收稿日期: 2009-10-13 接受日期: 2010-01-18

国家高技术研究发展计划(863计划)项目(No.2007AA100505, No.2008AA101006)和广西壮族自治区教育厅科研项目[桂教科研(2009)25号, No.200911MS203]资助

*通讯作者。Tel: 0771-3239202, E-mail: ardsshi@gxu.edu.cn

璃平皿(30 mm×10 mm)中, 放置于在 38.5 °C, 5% CO₂ 和最大饱和湿度的培养箱中 22~24 h 后, 再放入不含激素 FSH 的成熟培养液中成熟培养 22~24 h。44~48 h 之后, 观察极体(PB1)排出率, 并以此计算卵母细胞的体外成熟率。

1.2.3 卵母细胞的激活 卵母细胞经体外成熟培养 44~48 h 后, 反复轻轻吹打或者放入 0.1% 的透明质酸酶 5 min 除去卵丘细胞, 清洗 3 次, 放入 5 μmol/L 离子霉素(ionomycin, ION)中激活 5 min (激活液: 0.37355 mg ION+100 ml 培养液即为 5 μmol 的 ION), 再清洗两次, 放入 2 mmol/L 6-二甲氨基嘌呤(6-DMAP)中的培养液(DMAP: 0.03264 g 的 6-DMAP+100 ml 培养液即为 2 mmol 的 6-二甲氨基嘌呤)中培养 3~4 h。

1.2.4 卵母细胞的培养 将激活处理过后的卵母细胞用培养液清洗 2 遍, 然后放入已制作好 20 μl PZM-3 胚胎培养液(108 mmol/L NaCl, 10 mmol/L KCl, 2 mmol/L 乳酸钙, 0.35 mmol/L KH₂PO₄, 0.4 mmol MgSO₄, 25.07 mmol/L NaHCO₃, 1 mmol/L 谷氨酰胺, 5 mmol/L 亚牛磺酸, 20 ml/L BME 必需氨基酸, 10 ml/L MEM 非必需氨基酸, 3 g/L BSA)的微滴培养, 其上覆盖矿物油, 放入 38.5 °C, 5% CO₂ 和最大饱和湿度的 CO₂ 培养箱中培养。卵母细胞培养 48 h 观察分裂率, 隔天进行半换液 1 次, 7 d 记录囊胚率, 并观察和记录卵裂数、囊胚发育数及囊胚孵化数。

1.2.5 卵母细胞核的成熟评定 把去除卵丘细胞

的卵母细胞放到四角滴有石蜡油和凡士林(1:1)的载片上, 加盖玻片, 轻轻按压, 将卵的位置固定。放入无水乙醇: 冰乙酸(3:1)固定液中固定 24 h 以上, 再用间苯二酚蓝(40% 醋酸配制)染色 1~2 min, 在相差显微镜下观察卵母细胞核的形态和构造。

生发泡(germinal vesicle, GV)期: 卵内有一个较大的核, 位于近边缘处, 核膜清晰, 有的其中有一个核仁。染色质多为常染色质, 或呈染色质块形态分布于核仁周围(图 1)。

终变(diakinesis, DK)期, 发生 GVBD, 核膜和核仁消失, 染色质凝集成团块状(图 1)。

中期 I (metaphase I, MI): 染色体已形成, 并有规律地排列于赤道板上。但由于压片的原因, 往往只能看到数十条染色体聚拢在一起(图 1)。

后期 I 和末期 I (anaphase I and telophase I, Ana-I/Tel-I), 在压片中可以看到两团染色体存在, 其中一团将成为卵母细胞的 MII 期染色体, 另一团则将形成第一极体(图 1)。

中期 II (metaphase II, MII), 在卵周隙中见到第一极体(PB1)。在压片中, 可以看到有两团染色体存在, 相隔一定的距离, 其中有一团已形成染色质团, 即为第一极体, 另一团呈分散的染色体状态, 即为 MII 期染色体(图 1)。

1.3 实验设计

根据猪卵巢表面不同直径大小的卵泡, 探明各类卵泡的在卵巢表面的构成比例。将卵泡直径>2 mm

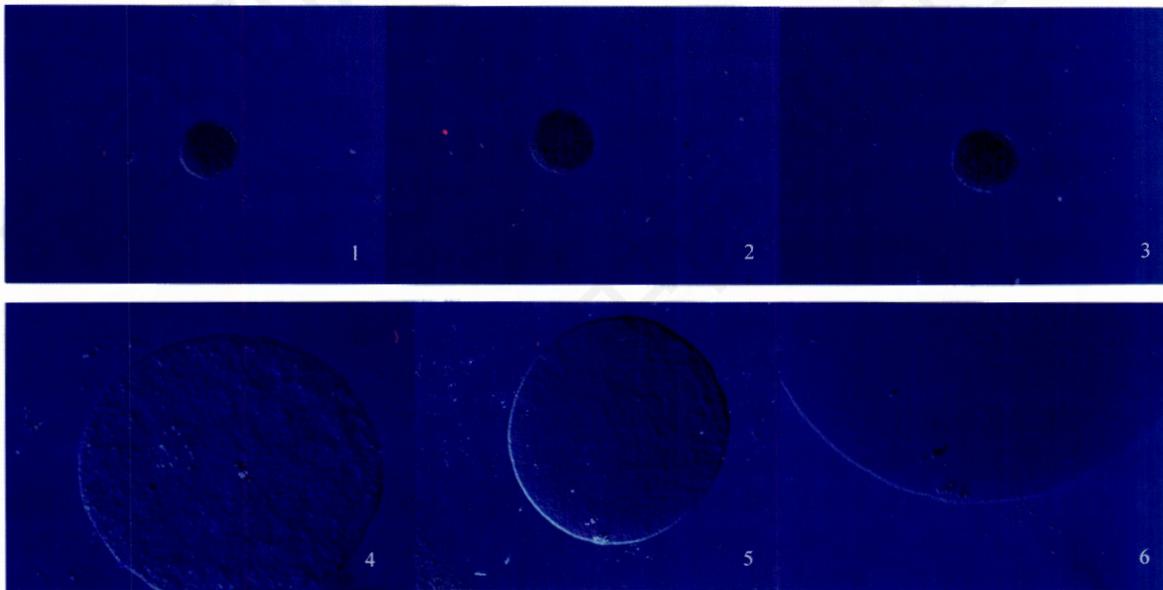


Fig.1 The nuclear meiotic progress of porcine oocytes

1: germinal vesicle, GV (100×); 2: diakinesis, DK (100×); 3: metaphase I, MI (200×); 4: anaphase I and telophase I, Ana-I/Tel-I (100×); 5: metaphase II, MII (200×); 6: metaphase II, MII (400×).

的猪卵丘卵-母细胞复合体(cumulus oocyte complexes, COC_s)进行不同时间内的体外培养,并探讨其成熟培养过程中减数分裂进程及其体外胚胎发育能力。

实验一:本实验针对猪卵巢上卵泡的数量及直径大小不同,卵泡内的卵母细胞处于不同发育阶段,造成体外成熟的卵母细胞成熟时间不一致,卵母细胞的成熟率不高。选择发育充分、质量优质的卵母细胞是胚胎工程的基础,因此,卵母细胞的种类和卵母细胞质量直接影响到后续的发育效果,因此,选择合适大小的卵巢表面的卵泡是获得体外成熟优质的卵母细胞的关键前提。本实验探讨和统计不同直径(分为直径<2 mm,直径2~6 mm,直径>6 mm)卵泡在卵巢表面的构成比例,弄清不同卵巢表面的不同直径大小的卵泡的分布情况和可利用卵泡的状况和种类,以期提高不同卵母细胞的发育同步化程度,提高卵母细胞的成熟质量,更有效地利用猪卵巢表面卵泡资源。

实验二:本实验的目的是探讨猪卵母细胞在不同时间内的体外成熟状况,了解卵母细胞核发育进程,为卵母细胞激活和胚胎培养以及为其后的显微操作提供发育充分的优质受体卵母细胞。本实验将直径卵泡(>2 mm)的卵母细胞分别在体外成熟培养0 h、4 h、8 h、12 h、16 h、18 h、22 h、28 h、32 h、36 h、40 h、44 h和48 h,在不同的成熟培养时间内,分别取出卵母细胞进行染色与固定,以确定不同时期卵母细胞核发育进程的状态,从而了解猪卵母细胞体外成熟过程中减数分裂核发育进程及规律。

实验三:本实验的目的是比较不同大小卵泡卵母细胞的发育潜能。根据卵巢表面的卵泡体积(直径<2 mm卵泡、2~6 mm卵泡和>6 mm卵泡)分为三组,分别抽取其中的卵母细胞进行体外成熟,而后进行孤雌激活和体外培养,以期了解不同大小卵泡内卵母细胞的发育潜能。

1.4 统计分析

所得数据采用卡方(χ^2)分析, $P < 0.05$ 即为差异显著。

2 结果

2.1 不同直径卵泡的构成比例

猪卵巢表面的直径<2 mm的卵泡、直径2~6 mm的卵泡和直径>6 mm卵泡分别占卵巢表面上卵泡总数的59.71%、37.70%和2.59%。直径<2 mm的卵泡分布占卵巢卵泡总数的大部分(图2)。

2.2 直径大于2 mm卵泡内的卵母细胞体外成熟0~48 h的核发育进程

猪卵母细胞减数分裂进程和卵母细胞的发育过

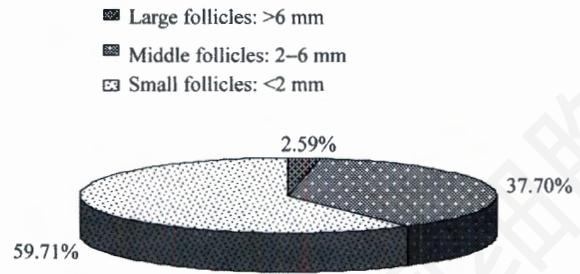


Fig.2 The percentage of different diameter follicles

程中,直径>2 mm的卵泡内的卵母细胞体外成熟培养0~48 h后,卵母细胞的核在发育进程中的GV、DK、MI、Ana-I/Tel-I和MII各时期所出现的发育阶段和比率如表1所示。

2.3 直径大于2 mm卵泡内的卵母细胞体外成熟培养过程中核成熟进程及规律

从直径>2 mm的卵泡内的猪卵母细胞在0~48 h内的核成熟曲线(图3)可以看出:在通常情况下,大部分直径>2 mm的卵泡内的猪卵母细胞成熟培养后的核成熟发育规律为:卵泡内的卵母细胞体外培养16 h,大部分发生GVBD;卵母细胞GV期的比率由0 h的68.00%下降到16 h的15.38%,此后GV期的比率一直保持下降趋势。体外成熟培养24 h、28 h和32 h的GV期的比率没有差异,分别为7.41%、4.49%和2.22%。在体外成熟培养20 h时,DK期的比率达到峰值(27.06%),而MI期的峰值(69.66%)出现在培养后28 h。成熟培养32~44 h时,Ana-I/Tel-I期的比率达到最高(53.33%)。猪卵母细胞体外成熟培养48 h时,MII期的比率达到最大值(为63.64%)。

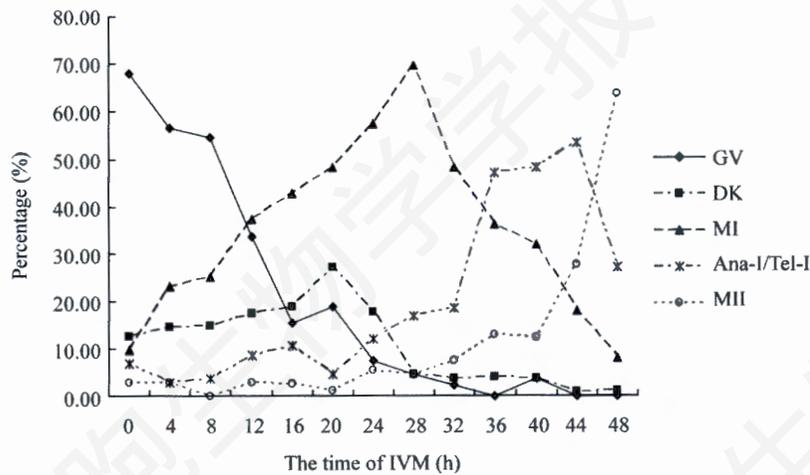
2.4 直径大于2 mm卵泡的卵母细胞的核成熟各时相出现的时间

为确定卵母细胞减数分裂各时相出现的具体时间,采用面积积分的统计学方法计算了直径>2 mm卵泡的卵母细胞核成熟过程中各时相出现的时间。结果发现,直径>2 mm的卵泡卵母细胞核成熟过程中各时相出现的时间不同(图4),大部分情况下,GVBD持续11.1 h;11.1~16.2 h处于DK期;16.2~33.7 h处于MI期;33.7~43.3 h处于Ana-I/Tel-I期,43.3~48 h处于MII期。

按照Sirard等^[2]报道的方法计算。猪卵母细胞在体外成熟培养时间为48 h,计算图中代表各时相的曲线与坐标轴围成的区域面积,并按代表每一时相的面积占总面积的比率换算成在总成熟时间中所占时间。这一数据可反映卵泡卵母细胞核成熟过程中各时相出现的时间。

Table 1 The nuclear status of porcine oocytes from follicles over 2 mm matured *in vitro* for 0–48 h

Maturation time	Oocytes	GV (%)	DK (%)	MI (%)	Ana-I/Tel-I (%)	MII (%)
0	175	68.00	12.57	9.71	6.86	2.86
4	69	56.52	14.49	23.19	2.90	2.90
8	62	54.59	14.84	25.23	3.58	0.00
12	104	33.65	17.31	37.50	8.65	2.88
16	117	15.38	18.80	42.74	10.51	2.56
20	85	18.82	27.06	48.24	4.71	1.18
24	108	7.41	17.59	57.41	12.04	5.56
28	89	4.49	4.49	69.66	16.85	4.49
32	67	2.22	3.70	48.15	18.52	7.41
36	102	0.00	3.92	36.27	47.06	12.75
40	81	3.70	3.70	32.10	48.15	12.35
44	105	0.00	0.95	18.10	53.33	27.62
48	187	0.00	1.07	8.02	27.27	63.64
Total No. of Oocytes	1 351	291	172	399	292	197

**Fig.3** The meiotic process of porcine oocytes from >2 mm diameter follicles during IVM**Fig.4** The meiotic progression of porcine oocytes from >2 mm follicles (h)

2.5 不同直径卵泡内卵母细胞体外成熟后孤雌发育能力比较

本研究表明,不同直径卵泡的猪卵母细胞孤雌激活后的体外发育能力不同(表2)。研究表明,直径<2 mm、直径2~6 mm、直径>6 mm的卵母细胞的成熟率分别为5.12%、66.62%和46.71%;分裂率分别为2.86%、72.11%和58.69%;囊胚率分别为0、28.62%和23.46%。直径<2 mm和>6 mm卵泡的卵母细胞的卵裂率明显低于直径2~6 mm卵泡的卵母细胞的卵

裂率($P<0.05$);卵泡直径2~6 mm组和卵泡直径>6 mm组的囊胚率没有显著差异($P>0.05$)。直径2~6 mm卵泡内的卵母细胞的体外成熟较快,体外发育潜能较高。

3 讨论

3.1 不同卵泡直径内的卵母细胞的比率

卵巢表面不同直径大小的卵泡众多,直径>6 mm的卵泡、直径2~6 mm的卵泡、直径<2 mm的卵泡各占卵巢表面总卵泡数的比率分别为2.59%、37.70%

Table 2 Parthenogenetic development of porcine oocytes from different size of follicles matured *in vitro*

Diameter of follicles	No. of oocytes cultured	Oocytes matured(%)	Oocytes cleaved (%)	BL developed (%)
<2 mm	684	35 (5.12) ^a	1 (2.86) ^a	0
2-6 mm	662	441 (66.62) ^b	318 (72.11) ^b	91 (28.62) ^a
>6 mm	653	305 (46.71) ^c	179 (58.69) ^c	42 (23.46) ^a

Note, ^{a-c}Within columns, values with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

和 59.71%。不同直径卵泡内的卵母细胞体外发育潜力各异,这与卵泡直径大小和卵泡内的卵母细胞所处的发育状况有关。

3.2 直径>2mm 的卵泡中卵母细胞减数分裂能力

本实验研究表明,直径>2 mm 的卵泡内的卵母细胞核成熟过程中减数分裂能力及各时相出现的时间均不相同。直径>2 mm 卵泡卵母细胞已经获得完成减数分裂的能力,在体外发育能力高。Eppig 等^[3]、Crozet 等^[4]、Fair 等^[5]和 Hyttel 等^[6]研究显示卵母细胞直径与卵母细胞各时期发育能力直接相关,卵母细胞体积约为成熟体积 80% 的时候才获得恢复并完成减数分裂的能力(小鼠卵母细胞直径 65 μm , 家畜 110 μm)。Eppig 等^[3]最早在鼠中发现卵母细胞的逐级获能现象,De Smedt 等^[7]和 Crozet 等^[4]研究发现山羊卵母细胞减数分裂能力是随着卵泡直径增加逐渐获得的。Fair 等^[5]和 Hyttel 等^[6]研究表明牛和猪直径 100 μm 的卵母细胞能够恢复减数分裂,但是不能发育到 MI 期以后。牛直径 110 μm 、猪直径 115 μm 的卵母细胞能够恢复并完成减数分裂而发育到 MII 期。众多研究结果提示,哺乳动物卵母细胞是在卵母细胞生长过程中逐渐获得减数分裂能力的。卵母细胞在发育至最大直径的过程中,首先获得恢复减数分裂的能力,然后才逐渐获得完成第一次减数分裂的能力。

本研究表明,卵母细胞的成熟分裂能力与卵泡的大小有关,进而影响了卵母细胞的核成熟分裂能力。不同动物卵泡腔出现时间不同。Hirshfield 等^[8]和 Lussier 等^[9]研究表明大鼠、牛和人的卵泡腔约在卵泡直径为 0.2~0.4 mm 时出现,Crozet 等^[4]研究表明猪卵泡腔在直径 0.4~0.8 mm 时出现,谭景和(1988)^[10]报道山羊卵泡腔在直径 0.15~0.2 mm 时出现。De Smedt 等^[7]和 Schramm 等^[11]研究表明小腔卵泡的卵母细胞仅具有部分的核成熟能力,减数分裂停止于 MI 期而不是 MII 期。

本研究表明猪卵泡直径小于 2 mm 的很难成熟,成熟率及分裂率很低。Crozet 等^[4]和 Eppig 等^[12]研究表明直径 2 mm 以上的有腔卵泡中的卵母细胞既能完成减数分裂,又有很多发育到囊胚。在本实验室成熟培养体系中,对不同直径猪卵泡内的卵母细胞研究发现,约 94.88% 直径<2 mm 卵泡卵母细胞尚未具有

恢复减数分裂能力,直径>2 mm 卵泡卵母细胞已具有完成减数分裂的能力。直径 2~6 mm 卵泡卵母细胞的体外孤雌发育的成熟率、卵裂率、囊胚发育率(66.62%, 72.11%, 28.62%)和直径>6 mm 卵泡内的卵母细胞的成熟率、分裂率、囊胚率(46.71%, 58.69%, 23.46%)均显著高于直径<2 mm 卵泡卵母细胞的成熟率、卵裂率和囊胚率(5.12%, 2.82%, 0)。以上研究结果表明,卵泡内的卵母细胞的核成熟能力以及体外成熟后支持后期发育的能力与卵泡直径密切相关,只有达到一定直径的卵泡,其卵母细胞才可以恢复和完成减数分裂,卵母细胞的胞质才能得以成熟。

3.3 卵母细胞减数分裂的恢复和核成熟进程

在卵母细胞成熟过程中,胞质发生一系列变化,这一过程中减数分裂停滞在 GV 期,细胞要积累后期发育所需的物质和特殊分子,这些分子是早期胚胎进行正常发育所必需的,否则有可能导致不育或胚胎发育异常^[13]。

吕忠显等^[14]研究表明,卵母细胞能否进行减数分裂与其在第一次减数分裂恢复之前物质积累程度密切相关。排出第一极体后停滞在第二次减数分裂中期。不同动物的卵母细胞,当其脱离卵泡环境后在体外自发恢复减数分裂(即发生GVBD)和成熟的时间不同。小鼠卵母体外成熟需 12~14 h, GVBD 在培养后的 2 h 内完成^[15];牛卵母细胞成熟需要 24 h, GVBD 发生在 6~11 h 内^[2,16];山羊卵母细胞成熟需要 24 h, GVBD 发生于 2~6 h 之间^[17];绵羊卵母细胞成熟需要 24 h, GVBD 发生在培养后 8 h 内^[18]。

本研究表明,在本实验室的成熟培养体系平台中,猪卵母细胞体外成熟需要 40~48 h。直径>2 mm 卵泡内的卵母细胞,在 16 h 内, GVBD 发生显著;24~32 h 后 GVBD 比率减少;在成熟培养 36 h 后,卵母细胞 GVBD 比率降到最低点。在 4 h 时,处于 DK 期, DK 期比率出现峰值的时间是 20 h; MI 期比率的峰值出现在 28 h。在 Ana-I/Tel-I 期时,成熟培养 44 h 时, Ana-I/Tel-I 期的比率达到峰值(53.33%)。成熟培养 48 h 时,在 MII 期比率达到最大值(为 63.64%)。48 h 猪卵母细胞排出第一极体(PB1)率为 63.50%。

在直径>2 mm 卵泡内的卵母细胞体外成熟过程中,0~11.1 h,大部分卵母细胞发生 GVBD; 11.1~16.2

h 时处于 DK 期; 16.2~33.7 h 处于 MI 期; 33.7~43.3 h 时处于 Ana-I/Tel-I 期; 43.3~48 h 处于 MII 期。绝大部分的猪卵母细胞在 43.3~48 h 这个时相完成第一次减数分裂, 排出 PB1, 达到成熟阶段。这揭示出在这个阶段可以有效地进行卵母细胞的激活、体外培养及其他胚胎生物工程的技术操作等, 卵母细胞成熟的合适时间为提高胚胎体外生产提供了理论基础和实践意义。

3.4 不同直径卵泡中卵母细胞体外孤雌发育能力

卵母细胞成熟效率与所在卵泡直径密切相关。不同直径卵泡的卵母细胞在体外成熟后的囊胚发育率存在明显差异。当卵泡直径达到 3 mm 以后, 卵母细胞除完成细胞核的最后成熟外, 还不断在细胞质中贮存 RNA, 蛋白质和其他因子以保障受精后胚胎的正常发育^[19]。

本研究表明, 来自不同直径的卵泡内的卵母细胞 <2 mm、2~6 mm 和 >6 mm 卵泡的卵母细胞的成熟率分别为 5.12%、66.62% 和 46.71%; 分裂率分别为 2.86%、72.11% 和 58.69%; 囊胚率分别为 0、28.62% 和 23.46%。其中, 来自于直径 <2 mm 卵泡组的卵母细胞的成熟率和孤雌激活后的卵裂率均显著低于来自其他组卵泡内的卵母细胞, 而来自于直径 >6 mm 卵泡组内的卵母细胞的卵裂率明显低于 2~6 mm 卵泡组的卵母细胞 ($P < 0.05$), 但它们的囊胚率之间没有显著差异 ($P > 0.05$)。这与 Tan 等^[20]和 Lonergan 等^[21]的结果相似。

曾申明等^[22]对牛不同大小的卵泡内的卵母细胞研究表明, 直径 2~8 mm 卵泡中卵母细胞的卵裂率和囊胚率显著高于直径 2 mm 以下卵泡中的卵母细胞, 揭示了卵母细胞在成熟期合成的物质对支持胚胎早期发育非常重要。本研究发现, 直径 >6 mm 猪卵泡中的卵母细胞体外成熟后, 进行孤雌激活, 其卵裂率明显低于 2~6 mm 卵泡中的卵母细胞, 但两组间的囊胚率无显著差异。直径在 2~6 mm 卵泡中的卵母细胞的卵丘细胞发育完整, 卵丘细胞扩展良好。这说明, 卵丘细胞的完整性在支持和促进猪卵母细胞成熟过程中发挥着重要作用。冯贵雪(2006)^[23]研究结果表明 2~6 mm 卵泡中的水牛卵母细胞发育能力好, 卵丘细胞在体外成熟过程中具有重要功能。朱桂玉等^[24]研究也表明卵丘细胞的完整性的重要作用。这些研究均表明, 合适直径的卵泡中的卵母细胞和完整的卵丘细胞所构成的卵丘卵母细胞复合体的完整性有利于发挥卵母细胞在体外成熟和体外培养中的发育潜力。这与从众多的研究结果是相一致的。直径 >6 mm 的猪卵泡中的卵母细胞在体内已成熟, 如果在体

外再经 44~48 h 培养, 卵母细胞可能会老化, 丧失随后的发育能力。Pavlok 等^[25]研究表明, 直径在 15 mm 以上卵泡中的牛卵母细胞在体外再经 20~22 h 培养后可能会老化。本实验中, 直径 >6 mm 猪卵泡中的卵母细胞体外成熟后, 其成熟率、分裂率和囊胚率均有所下降, 因此, 本实验研究结果表明, 大卵泡内的卵母细胞在体外成熟过程中可能会出现老化现象, 从而影响其后的发育潜能。Lonergan 等^[21]研究表明, 缩短大卵泡内的卵母细胞的体外成熟时间可能会提高胚胎体外生产效率。

参考文献(References)

- 1 Pincus G, Enzmann EV. The comparative behaviour of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. *J Exp Med* 1935; 62(5): 665-75.
- 2 Sirard MA, Florman HM, Leibfried-Rutledge ML, Barnes FL, Sims ML, First NL. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol Reprod* 1989; 40(6): 1257-63.
- 3 Eppig JJ, Schroeder AC. Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation, and fertilization *in vitro*. *Biol Reprod* 1989; 41(2): 268-76.
- 4 Crozet N, Ahmed-Ali M, Dubos MP. Development competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture *in vitro*. *J Reprod Fertil* 1995; 103(2): 293-8.
- 5 Fair T, Hyttel P, Greve T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol Reprod Dev* 1995; 42(4): 437-42.
- 6 Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 1997; 47(1): 23-32.
- 7 De Smelt V, Crozet N, Gall L. Morphological and functional changes accompanying the acquisition of meiotic competence of ovarian goat oocytes. *J Exp Zool* 1994; 269(2): 128-39.
- 8 Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* 1991; 124: 43-101.
- 9 Lussier JG, Matton P, Dufour JJ. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *J Reprod Fertil* 1987; 81(2): 301-307.
- 10 谭景和. 山羊卵巢内卵母细胞发育的光镜和超微结构研究. 东北农业大学博士论文 1988.
- 11 Schramm RD, Tennier MT, Boatman DE, Bavister BD. Chromatin configurations and meiotic competence of oocytes are related to follicular diameter in nonstimulated rhesus monkeys. *Biol Reprod* 1993; 48(2): 349-356.
- 12 Eppig JJ, Schultz RM, O'Brien MJ, Chesnel F. Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. *Dev Biol* 1994; 164(1): 1-9.
- 13 Eppig JJ, O'Brien M, Wigglesworth K. Mammalian oocyte growth and development *in vitro*. *Mol Reprod Dev* 1996; 44(2): 260-273.
- 14 Lu ZX, Xia GL. FSH can induce mouse cumulus oocyte to

- secrete a meiosis-activating substance *in vitro*. *Dev Reprod Biol* 2000; 9(1): 27-34.
- 15 Fulka J, Motlík JrJ, Fulka J, Jílek F. Effect of cycloheximide on nuclear maturation of pig and mouse oocytes. *J Reprod Fertil* 1986; 77(11): 281-5.
- 16 Tatemoto H, Horiuchi T. Requirement for protein synthesis during the onset of meiosis in bovine oocytes and its involvement in the autocatalytic amplification of maturation promoting factor. *Mol Reprod Dev* 1995; 41(1): 47-53.
- 17 Pawshe CH, Appa Roa KBC, Jain SK, Totey SM. Biochemical studies on goat oocytes: Timing of nuclear progression, effect of inhibitor and pattern of polypeptide synthesis during *in vitro* maturation. *theriogenology* 1994; 42(2): 307-20.
- 18 Moor RM, Crosby IM. Protein requirements for germinal vesicle breakdown in ovine oocytes. *J Embryol Exp Morph* 1986; 94: 207-20.
- 19 Barnes FL, Looney CR, Westhusin ME. Embryo cloning in cattle: the current state of technology. *Embryo Transfer Newsletter* 1991; 6 (1): 1-6.
- 20 Tan SJ, Lu KH. Effects of different oestrous cycle stages of ovaries and sizes of follicles on generation of IVF early embryos. *Theriogenology* 1990; 33(1): 335
- 21 Lonergan P, Carolan C, Van-Langendonck AV, Donnay I, Khatir H, Mermillod P. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development *in vitro*. *Biol Reprod* 1996; 54(6): 1420-9.
- 22 曾申明, 朱士恩, 余文莉, 李树静, 张忠诚, 陈永福. 卵泡直径和卵丘细胞对牛卵母细胞体外受精后发育潜力的影响. *农业生物技术学报* 2000; 8 (4): 357-60.
- 23 冯贵雪. 卵母细胞体外成熟及人胚胎玻璃化冷冻的研究. 广西大学博士论文 2006.
- 24 朱桂玉, 冯书堂, 李吉涛, 牟玉莲, 潘登科, 郭炳冉. 卵丘卵母细胞复合体与裸卵的基因差异表达. *中国农业科学* 2008; 41(1): 208-14.
- 25 Pavlok A, Lucas-Hahn A, Niemann H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol Reprod Dev* 1992; 31 (1): 63-7.

The Meiotic Progress of Porcine Oocytes Matured *in Vitro*

Ya-Qiong Huang^{1,2}, De-Shun Shi^{1*}, Xiao-Xi Zhang¹, Shun Zhang¹, Xu-Jian Chen², Jia-Zhou Li²,

Shi-Yuan Zeng², Gui-Wen Ruan², Shi-Hua Zhao², Shi-Jian Tan¹

(¹Institute of Animal Reproduction, Guangxi University, Nanning 530005, China;

²Yulin Normal University, Yulin 537000, China)

Abstract The meiotic progress and developmental competence of porcine oocytes matured *in vitro* were investigated in the present study. Most of oocytes from follicles over 2 mm in diameter were taken place germinal vesicle breakdown (GVBD) at 16 h after *in vitro* maturation (IVM), in which the proportion of oocytes in the GV stage was decreased from 68.00% to 15.38%. At 20 h after IVM, the percentage of oocytes in the diakinesis stage was increased to 27.06%, and most of oocytes (69.66%) matured to the MI stage at 28 h after IVM. At 32–44 h after IVM, the proportion of oocytes in the Ana-I/Tel-I stage was up to the peak value (53.33%). The percentage of porcine oocytes in the MII stage was up to the peak value (63.64%) at 48 h after IVM. The maturation rates of oocytes (extruded the first polar body, PB1) from follicles in diameter of <2 mm, 2–6 mm and >6 mm were 5.12%, 66.62% and 46.71%, respectively. The cleavage rates of oocytes from follicles in diameter of <2 mm (2.86%) and >6 mm (58.69%) were significantly lower than that of oocytes from follicles in diameter of 2–6 mm (72.11%, $P < 0.05$) after IVM and parthenogenetic activation. However, the blastocyst yield of oocytes from follicles in diameter of 2–6 mm (28.62%) was not different from that of oocytes from follicles in diameter over 6 mm (23.46%, $P > 0.05$). These results will provide necessary data for investigating the meiotic process and regulation of meiosis in porcine oocytes.

Key words pig; oocyte; meiosis; *in vitro* maturation

Received: October 13, 2009 Accepted: January 18, 2010

The work was supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2007AA100505, No.2008AA101006) and the Research Project of Education Department, Guangxi Zhuang Autonomous Region [Guangxi Education and Scientific Research (2009) No.25, No.200911MS203]

*Corresponding author. Tel: 86-771-3239202, E-mail: ardsshi@gxu.edu.cn