

# 牛体外受精技术研究的现状与展望

## The Current State of Bovine in Vitro Fertilization and Its Prospect

石德顺

Shi Deshun

(广西农业大学动物繁殖研究室, 南宁市秀灵路 13 号 530005)

(Animal Reproduction Laboratory, Guangxi Agricultural

University, 13 Xiuling Road, Nanning, Guangxi, 530005)

**摘要** 系统综述了牛体外受精技术研究的现状及存在的问题, 并对今后的研究方向和前景提出了展望。牛卵母细胞可在不含血清的成熟培养液中获得受精及胚胎发育能力, 促卵泡素、促黄体素及上皮细胞生长因子均对这一过程具促进作用。肝素是迄今最为有效的精子获能处理方法, 但在受精过程中对精子获能起决定作用的是卵丘细胞和卵母细胞本身。提高受精质量可明显提高受精卵的胚胎发育能力。体外受精卵可通过改善培养条件或与体细胞进行复合培养发育到囊胚阶段, 但后者更为稳定可靠。目前, 牛卵母细胞的体外受精分裂率可达 80%, 囊胚发育率达 40% 左右, 两枚鲜胚的移植妊娠率可达 50%~60%, 而两枚冻胚的移植妊娠率仅 30%~50%。因此, 尚需进一步提高体外受精胚胎的活力和改进胚胎的冷冻保存技术。

**关键词** 牛 卵母细胞 体外受精。

**Abstract** The current state of bovine in vitro fertilization (IVF) and the problem existed in this technique are reviewed. Meanwhile, the research direction and prospect of this technique are also presented. Bovine oocytes can acquire their competence for fertilization and embryonic development in a serum free maturation medium during the in vitro maturation (IVM), and this process can be enhanced by addition of follicle stimulating hormone, luteinizing hormone and epithelial growth factor to the maturation medium. Heparin has been the most effective capacitation treatment for bovine sperm, but the sperm capacitation during IVF is mainly dependent on cumulus cells and oocytes. Zygotes derived from IVM/IVF can be in vitro cultured (IVC) into the blastocyst stage by improving the culture condition or co-culturing them with somatic cells, but the result achieved with the co-culture system is much satisfactory. The yield of blastocysts derived from IVM/IVF/IVC is also strongly related to the quality of IVF. As to the efficiency of the current IVM/IVF/IVC system, the frequencies of oocytes cleaved and developed to blastocysts are about 80% and 40% respectively. The pregnant rate is about 50% to 60% by transferring two fresh embryos, but only 30% to 50% by transferring two frozen/thawed embryos. Therefore, the freezing technique and viability of IVF embryos are still waiting to be improved further.

**Key words** bovine, oocytes in vitro fertilization

自 1982 年美国学者 Brackett 等报道了世界首例体外受精的试管犊牛以来<sup>[1]</sup>, 牛体外受精技术进展很快。世界首例完全体外化试管双犊的成功报道<sup>[2]</sup>, 又使牛体外受精技术大大向前迈进了一步。近年来, 各国学者针对与胚胎最终产量和质量密切有关的三个环节, 即卵母细胞的体外成熟、体外受精和受精卵的体外培养进行了大量的研究工作, 并取得了很大进

展。本文将就这三个环节的研究现状作一综述, 并对存在的问题和前景提出探讨和展望。

### 1 卵母细胞的体外成熟

牛卵母细胞的体外成熟首次由 Edwards 完成<sup>[3]</sup>, 但这仅限于核的成熟。牛卵母细胞体外成熟的胚胎发育潜能直到 1978 年才由 Newcomb 等通过体内受精获得犊牛证实<sup>[4]</sup>。1986 年, Critser 等又报道了牛卵母

细胞经体外成熟及体外受精获得的试管犊牛<sup>[5]</sup>,进一步确证了体外成熟牛卵母细胞的可行性。

目前,用于牛卵母细胞体外成熟的培养液多为M199加10%胎犊血清(FCS)或发情牛血清(OCS),也有的使用Ham's F-10, MEM, TALP或其他组织培养液加血清。然而,近来的报道表明:体外成熟在不含血清M199中的卵母细胞亦可获得受精及胚胎发育能力<sup>[6,7]</sup>,作者的研究亦取得了相同结果。

近来的研究否定了以前得出的许多结论,如摇动培养及添加颗粒细胞在卵母细胞体外成熟中的作用。但激素对牛卵母细胞体外成熟的影响则一直是一个悬而未决的问题。一些报道表明:激素能提高牛卵母细胞的胚胎发育能力,而另一些报道则否定激素的作用。作者的研究亦表明:激素对牛卵母细胞的体外成熟无任何作用。然而,近来的许多报道表明:在没有血清存在的条件下,FSH及LH均明显提高牛卵母细胞的胚胎发育能力<sup>[7,8]</sup>。Zuelke和Brackett的研究亦证实:LH可促进牛卵母细胞谷氨酰胺的代谢<sup>[9]</sup>。

近来的报道表明:卵泡液(20%~30%)可明显提高卵母细胞的胚胎发育能力<sup>[10,11]</sup>。作者的研究亦取得了同样结果,并进一步证实卵泡液的这种成熟促进因子系来自内膜细胞,而不是颗粒细胞<sup>[27]</sup>。

添加生长因子是另一条提高牛卵母细胞体外成熟质量的途径。已有报道表明:EGF可起到FSH和LH的同样效果<sup>[8]</sup>。

卵母细胞体外成熟的气相环境大都采用含5%CO<sub>2</sub>的空气(20%O<sub>2</sub>)。有研究显示:成熟在20%O<sub>2</sub>与5%O<sub>2</sub>条件下的牛卵母细胞,其受精率及分裂率虽无明显差异,但胚胎发育率则前者明显高于后者<sup>[12]</sup>。

## 2 精子的获能及体外受精

精子在受精前要获得受精能力。精子获能的两个明显特征是具有发生顶体反应的能力和表现出异常高的活动能力。牛精子体外获能的主要处理方法有:高离子强度溶液,卵泡液,钙离子载体A23187,肝素,脂质体,咖啡因及输卵管细胞等。其中,效果最为稳定可靠的是肝素。Niwa和Ohgoda报道:肝素和咖啡因在牛精子的体外获能过程具有协同作用<sup>[13]</sup>,Park等亦得到了同样结果<sup>[14]</sup>。但由于咖啡因不利受精卵的早期胚胎发育,其在体外受精中的应用亦不是很普及。目前,用于牛精子体外获能的主要方法是肝素加或不加咖啡因,亦有人使用A23187加咖啡因。

作者的研究发现:未经肝素作获能处理的精子亦可取得73%的受精分裂率,且肝素的体外受精促进

作用取决于受精滴中的肝素浓度,与精子预处理15分钟的肝素浓度无关。由此说明:对精子获能起决定作用的是卵丘细胞和卵母细胞本身,而现有的获能处理方法仅在一定程度上起着促进或协同作用。Marquant-Le和Thibault的研究亦得出了同样结论<sup>[15]</sup>。

研究不同公牛个体的体外受精试验发现:不仅公牛间的分裂率有明显差异,受精卵的胚胎发育能力差异则更为明显。由此说明:受精质量对受精卵的胚胎发育能力有明显影响。作者的研究表明:通过提高肝素浓度,添加PAF及卵泡内膜细胞的条件液可明显提高受精卵的胚胎发育率。

精子和卵子的孵育时间是影响受精质量的一个重要方面。根据获能处理方法及受精液成分,可将孵育时间定为6~8小时和20~48小时。前者系采用A23187作获能处理或受精液中含有咖啡因,后者仅采用肝素作获能处理。有报道表明:用肝素作获能处理的最佳孵育时间为24小时<sup>[16]</sup>。

## 3 受精卵的体外培养

由于胚胎体外发育“阻断”的存在,如何将体外受精卵培养成能进行非手术移植的桑椹胚或囊胚一直是胚胎体外培养的研究热点之一。经过近年来的大量研究工作,已取得很大突破。目前,体外培养体外受精卵通过发育“阻断”的途径大致有两条:一是与体细胞进行复合培养(Co-culture),二是改善培养条件。

由于胚胎的体内发育得到输卵管上皮细胞的支持作用,故人们最先考虑的是利用输卵管上皮细胞,并获得成功。目前,用于复合培养的体细胞除输卵管上皮细胞外,还有颗粒细胞,子宫内膜细胞,滋养层细胞和羊膜囊细胞等,其中以输卵管上皮细胞和颗粒细胞最为普及,且结果均令人满意。McCaffrey等报道:复合培养在输卵管上皮单层细胞上的体内受精卵(来自超排),其囊胚发育率可达80%<sup>[17]</sup>。由此说明:现有的复合培养系统是有效的。

除将胚胎与体细胞直接接触进行复合培养外,还利用体细胞分泌的因子即条件液来培养受精卵,但效果不如直接复合培养效果好。

由于发育“阻断”可能是由于胚胎在该阶段对外界条件特别敏感所致,故改善培养条件亦有可能使胚胎通过体外发育“阻断”。已有的报道表明:将氧的浓度降低到5%能有效的促使体外受精卵发育至囊胚阶段<sup>[18]</sup>,在培养液中添加细胞外基质因子(肝素和Fibronectin)<sup>[19]</sup>或生长因子(TGF-β和FGF)<sup>[20]</sup>亦有效地促使胚胎通过8~16细胞“阻断”。作者的研究发

现:通过改良培养液成分,可取得与复合培养系统相近的胚胎培养效果。

#### 4 胚胎体外生产系统的效率及其胚胎的移植效果

据 Brackett 和 Zuelke 最近的综述报告<sup>[21]</sup>:牛卵母细胞的受精分裂率达 85%,囊胚发育率达 40%。作者亦曾报道过 85%的分裂率,近 50%的囊胚发育率<sup>[22]</sup>。就大规模的生产试验而言,亦有 80%的分裂率,32.3%的囊胚发育率的报道<sup>[23]</sup>。在国内条件下,作者亦取得了 78.47%的分裂率及 41.4%囊胚发育率的结果<sup>[24]</sup>。据报道:这些体外胚胎经移植后,两枚鲜胚的妊娠率可达 50%~60%<sup>[21]</sup>,两枚冻胚的妊娠率则在 30%~50%<sup>[25]</sup>。我们在国内的移植试验亦取得了相同的结果,且发现冻胚的流产死胎率较高。说明体外冷冻胚胎的移植仍存在一定问题。

#### 5 存在问题分析

目前,利用牛体外受精技术生产牛胚胎的商业性公司虽已有几家,但困难重重,均无盈利可言。其存在的主要问题是胚胎质的问题。胚胎质的问题包含两方面的含义,一是胚胎的种质问题,二是胚胎本身的活力问题。

由于胚胎生产所用的卵巢均来自屠宰场,很难做到良种化,这就给胚胎的价值和销路带来一定问题。核移植技术是解决该问题的途径之一,但由于成功率及各技术环节所固有的一些问题,目前尚很难应用。解决该问题的另一途径是活体采卵。Kruip 等用阴道内超声波指导卵泡穿刺法对 24 头牛进行每周两次,连续三个月的活体采卵,结果平均每周每头回收到卵母细胞 13 枚,获得胚胎 2.2 枚,且对生殖道无有害作用<sup>[26]</sup>。由此表明:活体采卵技术是解决良种卵源的有效途径之一。解决体外胚胎种质问题的第三途径是开发利用未充分生长的腔前卵母细胞,在小鼠虽已有成功报道,但在牛尚无成功的报道。

体外胚胎的活力问题是牛胚胎体外生产技术所面临的一大难题。为便于分析这一问题,我们将体内胚胎的活力系数定义为 1.0,保证正常妊娠所需的胚胎活力系数为 0.5(根据二分胚的结果)。如将现有体外成熟卵母细胞的活力系数假定为 0.7,胚胎体外培养系统的效率系数为 0.7,那么体外胚胎的活力系数将为 0.49(图 1)。如移植这些鲜胚,其妊娠率可接近正常。如经冷冻后,胚胎的活力将大大降低,加上体外胚胎的结构特点(卵裂球间联结松散)与冷冻过程的互作效应,将使得其正常妊娠产犊率大大降低。

因此,解决体外胚胎的活力问题应从三方面着手。一是体外控制卵母细胞的核成熟,使卵母细胞质在体外有充分的时间得以成熟,活力系数得以大大提高。二是从生理学、生物化学及生物物理学的角度出发,重新建立一套高效的胚胎体外培养系统。三是根据体外胚胎的结构特点,继续研究体外胚胎的冷冻保存,以降低卵裂球间细胞联结在冷冻过程中的损害程度。

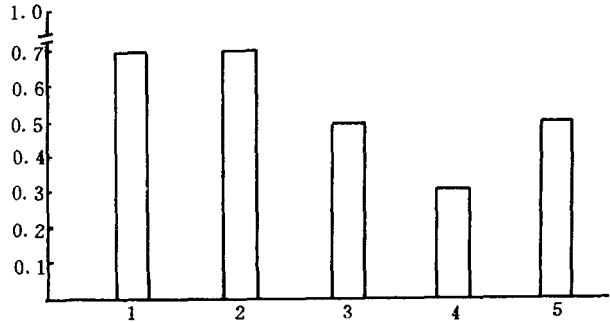


图 1 牛体外胚胎活力问题的分析

Fig. 1. Analysis of problems about viability of bovine in vitro embryos

1. 体外成熟卵的活力 Viability of in vitro maturation oocyte;
2. 胚胎培养系统的效率 Efficiency of embryo culture system;
3. 体外胚胎的活力 Viability of in vitro embryo;
4. 体外冷冻胚的活力 Viability of in vitro frozen embryo;
5. 正常妊娠所需胚胎活力 Viability of embryo for normol pregnant

#### 6 展望

目前,虽然牛体外受精技术在商业化过程遇到了这样或那样的问题,但其前景是相当广阔的。通过该技术可获得大量而廉价的卵母细胞、受精卵和胚胎,这无论是对于畜牧生产还是科学研究,其意义都是无法估量的。体外受精技术已经成为当今胚胎工程技术中的一项基本而又关键的技术。离开了体外受精技术,其他胚胎工程技术将失去其应有价值。随着研究工作的不断深入,存在问题的不断解决,它将在畜牧生产和科学研究中发挥出愈来愈重要的作用。

#### 参考文献

- 1 Brackett R G, Bousquet D, Boice M L, et al. Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol. Reprod.* 1982, 27: 147~158.
- 2 Lu K H, Gordon I, Chen H B, et al. Birth of twins after transfer of cattle embryos produced by in vitro techniques. *Vet. Record.* 1988, 122: 539~540.
- 3 Edwards R G. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature.* 1965, 196: 349~351.
- 4 Newcomb R, Christie W B, Rowson L E A. Birth of calves after in vivo fertilization of oocytes removed from follicles and matured in vitro. *Vet. Record.* 1978, 102: 461~462.

- 5 Critser E S, Leibfried-Rutledge M L, Eyestone W H, et al. Acquisition of developmental competence during maturation in vitro. *Theriogenology*. 1986, 25; 150.
- 6 Saeidi K, Hoshi M, Leibfried-Rutledge M L, et al. In vitro fertilization and development of bovine oocytes matured in serum-free medium. *Biol. Reprod.* 1991, 44; 256~260.
- 7 Eyestone W H, de Boer, H A FSH enhances developmental potential of bovine oocytes matured in chemical defined medium. *Theriogenology*. 1993, 39; 216.
- 8 Harper K M, Bracdet B G. Bovine blastocyst development after in vitro maturation in a defined medium with epidermal growth factor and low concentration of gonadotropins. *Biol. Reprod.* 1993, 48; 409~416.
- 9 Zuelke K A, Brackett B G. Increased glutamine metabolism in bovine cumulus cell-enclosed and denuded oocytes after in vitro maturation with luteinizing hormone. *Biol. Reprod.* 1993, 815~820.
- 10 Iritanin A, Cheng Z S, Utsumi K. Effects of follicular factor on the IVM-IVF bovine oocytes. *Proc. 12th Int. Congr. Anim. Reprod. (The Hague)*, 1992, 342.
- 11 Larcocca C, Kmaid S, Calvo J. Effect of follicular fluid and estrus cow serum on maturation, fertilization and development of the bovine oocyte in vitro. *Theriogenology*. 1993, 39; 253.
- 12 De Azambuja R M, Moreno J F, Kraemer D, et al. Effect of gas atmosphere on in vitro maturation of bovine oocytes. *Theriogenology*. 1993, 39; 184.
- 13 Niwa K, Ohgoda O. Synergistic effect of caffeine and heparin on in vitro fertilization of cattle oocytes matured in culture. *Theriogenology*. 1988, 30; 733.
- 14 Park C K, Ohgoda O, Niwa K. Penetration of bovine follicular oocytes by frozen-thawed spermatozoa in the presence of caffeine and heparin *J. Reprod. Fert.* 1989, 86; 577~582.
- 15 Maquant-Le Guienne B, Thibault C. Fecondation in vitro d'ovocytes bovins matures in vivo ou in vitro. In 25th Coll. Soc. Fr. Et Fertil, pp. 145~150. Masson, Paris, 1987.
- 16 Rehman N, Collins A R, Wright Jr R W. Effect of sperm exposure time on in vitro fertilization and embryo development of bovine oocytes. *Theriogenology*. 1993, 39; 294.
- 17 McCaffrey C, McEvoy T G, Diskin M G, et al. Successful co-culture of 1-4-cell ova to the morula or blastocyst stage. *J. Reprod. Fert.* 1991, 91; 119~124.
- 18 Nagao Y, Saeki K, Kainuma H. Effect of oxygen concentration on the development of in vitro matured and fertilized bovine oocytes cultured in a protein-free medium. *Theriogenology*. 1993, 39; 273.
- 19 Larson R C, Ignatz G G, Currie W B. Development of in vitro fertilized bovine embryos beyond the 8-cell block using completely defined medium containing fibronectin. *Abstract Series No. J. Reprod. Fert.* 1989, 3; 20.
- 20 Larson R C, Ignatz G G, Currie W B. Defined medium containing TGF- $\beta$  and bFGF permits development of bovine embryos beyond the "8-cell block". *Abstract Series, No. J. Reprod. Fert.* 1990, 5; 22.
- 21 Brackett B G, Zuelke K A. Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology*, 1993, 39; 43~64.
- 22 Shi D S, Lu K H, Gordon I, et al. Variation in cleavage and embryonic development of bovine oocytes in vitro fertilized with different bull ejaculates. *Theriogenology*. 1993, 35; 271.
- 23 Lu K H, Polge C. A summary of two-year's results in large scale in vitro bovine embryo production. *Proc. 12th Int. Congr. Anim. Reprod. (The Hague)* 1992, 3; 1315~1317.
- 24 石德顺, 凌泽继, 蒋和生等. 国内条件下牛体外受精程序的建立. 863 计划生物技术领域年会论文摘要. 1991~1992.
- 25 Kajihara Y, Kometani N, Shitanaka Y, et al. Pregnancy rates and births after the direct transfer of frozen-thawed bovine IVF embryos. *Theriogenology*. 1992, 37; 233.
- 26 Kruip Th A M, Boni R, Roelofsen M W M, et al. Application of OPU for embryoproduction and breeding in cattle. *Theriogenology*. 1993, 39; 251.
- 27 石德顺, 卢克焕. 卵泡细胞对牛卵母细胞体外成熟的影响. *广西农业大学学报*. 1992, 11 (4); 66~72.

(责任编辑: 蒋汉明)

(上接第 64 页 Continue from page 64)

电流大的系统, 或者变电站引出的主干线, 单回线路建议采用三角形排列; 双回共杆线路建议采用垂直排列。

如果其他条件不变, 将导线换大或者换为钢芯铝绞线, 偏距  $D$  如表 3 所示。

可见, 将导线换为钢芯铝绞线对减少配电线路由于短路电动力造成碰线事故, 效果很好。表 3 钢芯铝

绞线 LGJ-70 比铝绞线 LJ-70 弧垂减小 37.5%。

#### 参考文献

- 1 李如虎. 配电线路导线间电动力造成碰线的分析、推导和预防措施. *广西电力技术*. 1983, (2).
- 2 张节容等. 高压电器原理和应用. 北京: 清华大学出版社, 1989.
- 3 水电部. 架空配电线路设计技术规程 (SDJ206-87) 及条文说明. 北京: 水利电力出版社.

(责任编辑: 梁积全)