

分类号	
-----	--

单位代码	10113
学号	2000108

山西农业大学
博士研究生毕业论文

山羊胚胎体外生产体系的优化以及胚胎 干细胞分离培养技术的研究

研究生姓名：吕丽华

导 师：岳文斌教授

学科·专业：动物遗传育种与繁殖

研究方向：动物繁育生物技术

中国·山西·太谷

2004年6月

Shanxi Agricultural University

PH • D • DISSERTATION

Study on the Optimization of in vitro Culture System of
Embryos and Isolation and Generated Culture Technology of
Embryo Stem Cells in Goats

Ph • D• Candidate: Lv Lihua

Supervisor: Professor Yue Wenbin

Department: Animal Science

Major: Animal Genetics Breeding
and Reproduction

June, 2004

论文由山西省青年基金项目资助

山羊卵母细胞体外成熟最佳培养体系构建

The Project Supported by Great Youth Plan of Science and
Technology in ShanXi Province

项目编号：20031046

致 谢

本研究是在导师岳文斌教授的悉心指导下完成的，值此论文完成之际，我由衷地感谢导师对我的鼓励和帮助。四年来，岳老师不仅在学业上给予我深深的教诲，更教会我如何做人。岳老师渊博的知识，对科研的执著以求和高尚的人格时时激励着我不断进步。同时也衷心感谢我师母在我学习和生活中给予的关心和帮助，特别是在我做试验的过程中，给予我家庭的帮助。

感谢郭传甲教授、周忠孝教授、黄应祥教授、博士后刘文忠教授等在论文开题和评审中给予的指导和帮助。

感谢西北农业大学张志平博士在试验中给予的实验操作技术的指导和帮助。

感谢山西农业大学刘文忠教授在论文定稿中给予的关心和帮助。

感谢我的爱人李富忠副教授在采样、数据处理、照相等试验中给予的关心和帮助。

感谢谭景和老师、岳奎忠老师及山东农大动物生殖发育与胚胎工程中心老师给予的指导和帮助。

感谢中国农科院研究生院许雷老师、中国农科院植保所张杰老师等给予的指导和帮助。

感谢中国农业大学郑江霞博士(师妹)、杜卫华博士、袁建霞博士、张春香博士(师妹)、杨晓叶博士及中国人民大学张云华博士等在论文及实验的准备中给予的关心和帮助。

感谢师姐杨文平博士，师弟张建新博士、任有蛇博士、师妹薛惠良博士、秦巧梅硕士等在试验过程中给予我的关心和帮助。

感谢山西农业大学曹果清博士、郝晓燕博士、范瑞文博士、朱文进博士、张桂贤博士、我的好友乔利英硕士、刘建华老师、张引红硕士、李建国硕士、李艳红硕士、李红梅硕士、杨华硕士等的关心和帮助。大家在一起互相关心，诚挚相处，互助互勉。

感谢山西农业大学动科院高级实验员杨桂英老师、胡文革老师、农学院高级实验员冯文新老师在实验过程中给予的关心和帮助。

感谢山西农业大学学校领导、研究生处领导和老师、动科院领导的支持和帮助。

感谢山西农业大学刘文生老师、李平则老师、陈明华老师的关心和帮助。

感谢所有给予我教诲和帮助的老师 and 同学们！

感谢亲爱的父母、爱人和儿子等家人给予我的支持和帮助，特别是我妹妹承担起家务的重任，使我集中精力致力于实验室工作和论文的写作。

任何一篇优秀论文都是大家智慧的结晶，倾注着每一位给予指导、帮助、支持和鼓励者的汗水和心血。

最后，我要向我的恩师和所有关心、爱护我的人们保证，我将一如继往，勤奋学习，努力工作，正直做人。

目 录

中文摘要	1
前言	3
第一章 文献综述	5
第一节 卵母细胞体外成熟的研究进展	5
1 哺乳动物卵母细胞体外成熟的研究概况	5
2 哺乳动物卵母细胞发生、发育和成熟规律及调控机理	6
2.1 哺乳动物卵泡卵母细胞的发生	6
2.2 哺乳动物卵泡卵母细胞发育及成熟的一般过程	7
2.2.1 减数分裂启动及核网阻滞期	8
2.2.2 卵母细胞生长期	8
2.2.3 减数分裂恢复期	9
2.2.4 卵母细胞在 MII 期的停滞	9
2.3 哺乳动物卵母细胞体外成熟培养超微结构变化	9
2.4 哺乳动物卵母细胞生长和成熟过程的分子调控机理	10
2.4.1 成熟分裂阻滞	10
2.4.2 卵母细胞生长的调控	12
2.4.3 成熟分裂恢复	13
3 卵母细胞体外成熟培养的影响因素	17
3.1 成熟培养液对卵母细胞的影响	17
3.2 激素对卵母细胞体外成熟培养的影响	19
3.3 生长激素和生长因子的作用	20
3.4 卵泡液和颗粒细胞对卵母细胞体外成熟培养的影响	21
3.5 卵泡大小和卵丘细胞对卵母细胞体外成熟的影响	22
3.6 其他添加物对卵母细胞体外成熟培养的影响	24
3.7 延迟成熟培养	25
3.8 其它条件对卵母细胞成熟的影响	25
第二节 哺乳动物体外受精和早期胚胎体外培养的研究进展	26
1 精子获能	27
1.1 精子获能的概念及特点	27
1.2 精子获能后的变化	28
1.3 影响精子获能的因素	28
1.3.1 环境因素	28

1.3.2 获能液和获能方法	29
1.3.3 影响精子获能的物质	29
2 体外受精	30
2.1 体外受精过程	30
2.2 影响体外受精的因素	31
3 胚胎培养体系	32
3.1 体内胚胎和体外胚胎发育的对比	32
3.2 胞质的不完全成熟是胚胎早期发育阻滞的主要原因	32
3.3 能量物质和蛋白质等有机物对胚胎发育的影响	33
3.3.1 能量物质对胚胎发育的影响	33
3.3.2 蛋白质及生长因子对胚胎发育的影响	35
3.3.3 氨基酸及粘多糖对胚胎发育的影响	37
3.4 抗氧化作用	38
3.5 培养液及共培养体系对胚胎发育的影响	39
3.5.1 培养液对胚胎发育的影响	39
3.5.2 共培养体系对胚胎发育的影响	39
3.6 物理因素对胚胎发育的影响	40
3.6.1 氧气浓度和无机离子及渗透压对胚胎发育的影响	40
3.6.2 其它方面的影响	41
第三节 哺乳动物胚胎干细胞的研究进展及应用前景	42
1 胚胎干细胞的生物学特性	42
2 各种动物 ES 细胞的研究进展	43
2.1 小鼠 ES 细胞的研究进展	43
2.2 仓鼠 ES 细胞的研究进展	44
2.3 牛 ES 细胞的研究进展	44
2.4 猪 ES 细胞的研究进展	45
2.5 羊鼠 ES 细胞的研究进展	46
2.6 兔 ES 细胞的研究进展	46
2.7 猴 ES 细胞的研究进展	46
3 胚胎干细胞的建系方法	46
3.1 早期胚胎来源及适宜分离培养的时间	46
3.2 胚胎干细胞分离培养方法	47
3.2.1 全胚胎培养法	47
3.2.2 ICM 培养法	47
3.2.3 克隆法	47

3.3 胚胎干细胞鉴定方法	47
3.3.1 形态学鉴定	47
3.3.2 免疫学鉴定	47
3.3.3 核型分析	48
3.3.4 体内分化试验	48
3.3.5 体外分化试验	48
3.3.6 嵌合体实验	48
3.4 胚胎干细胞的冻存及解冻	48
4 胚胎干细胞的应用前景	49
4.1 生产克隆动物	49
4.2 ES 细胞是基因修饰的高效载体	49
4.3 生产用于人类器官移植的动物器官	50
4.4 建立人类遗传病研究的动物模型	51
4.5 研究胚胎发育的基因调控	51
第二章 山羊卵母细胞体外成熟培养	53
1 材料和方法	53
1.1 液体	53
1.1.1 操作液	53
1.1.2 成熟培养液	53
1.2 山羊卵丘-卵母细胞复合体的收集与培养	53
1.3 COC 复合体的分级	54
1.4 卵母细胞成熟的判定	54
1.5 受精处理及胚胎培养	55
1.6 数据处理	55
2 结果	55
2.1 不同分级卵母细胞的成熟比较	55
2.2 不同成熟时间对山羊卵母细胞成熟的影响	57
2.3 成熟液中添加不同浓度雌激素对山羊卵母细胞成熟的影响	57
2.4 HT 和 β -ME 对卵母细胞成熟的影响	58
2.5 不同成熟激素对山羊卵母细胞成熟的影响	59
3 讨论	59
3.1 不同分级卵母细胞的成熟分析	59
3.2 不同成熟时间对山羊卵母细胞成熟的影响	60
3.3 成熟液中添加不同浓度雌激素对山羊卵母细胞成熟的影响	60
3.4 HT 和 β -ME 对卵母细胞成熟的影响	61
3.5 不同成熟激素对山羊卵母细胞成熟的影响	62

4 结论	62
第三章 山羊卵母细胞体外受精方法的研究	63
1 材料与amp;方法	63
1.1 卵母细胞采集和成熟	63
1.2 体外受精	63
1.2.1 受精液	63
1.2.2 精子的准备	63
1.2.3 精子获能	64
1.2.4 体外受精	64
1.2.5 受精率的观察	64
1.2.6 胚胎培养	64
1.2.7 胚胎细胞计数	64
1.2.8 数据处理	64
2 结果	64
2.1 肝素、咖啡因和钙离子载体对受精和胚胎发育的影响	64
2.2 精子的不同处理方法对卵裂率和囊胚率的影响	66
3 讨论	68
3.1 肝素、咖啡因和钙离子载体对山羊精子获能、受精和胚胎发育的影响	68
3.2 精子的不同处理方法对卵裂率和囊胚率的影响	68
4 结论	68
第四章 山羊胚胎体外培养	69
1 材料和amp;方法	69
1.1 山羊卵母细胞体外成熟和受精	69
1.2 胚胎培养	69
1.2.1 颗粒细胞制备	69
1.2.2 输卵管上皮制备	70
1.3 胚胎培养	70
1.4 囊胚细胞计数	70
2 结果	71
2.1 不同共培养系统对受精后胚胎发育的影响	71
2.2 胚胎培养液中添加 BSA、FCS 和不同换液程序对胚胎发育的影响	72
2.3 不同培养液在共培养系统的支持下对胚胎发育的影响	73
3 讨论	74
3.1 不同共培养系统对受精后胚胎发育的影响	74
3.2 培养液中添加 BSA、FCS 和不同换液程序对胚胎发育的影响	74
3.3 不同培养液在共培养系统的支持下对胚胎发育的影响	75

4 结论	75
第五章 山羊体外胚胎和体内胚胎的超微结构比较	77
1 材料和方法	77
1.1 体内胚胎的生产	77
1.2 体外胚胎的生产	77
1.2.1 卵母细胞成熟	77
1.2.2 精子体外获能和受精	77
1.3 试验设计	78
1.3.1 受精卵分组	78
1.3.2 观察内容	78
1.4 电镜切片制备	78
1.4.1 电镜切片制作	78
1.4.2 线粒体的观察	78
2 结果	78
3 讨论	82
4 结论	84
第六章 山羊胚胎干细胞的分离培养	85
1 材料	85
1.1 实验动物	85
1.2 主要试剂	85
1.3 主要设备	86
2 方法	86
2.1 主要溶液配制	86
2.1.1 无钙、镁 DPBS 缓冲液的配制	86
2.1.2 消化液的配制	86
2.1.3 1mol/L β -巯基乙酸的配制	87
2.1.4 DMEM 培养液的配制	87
2.1.5 丝裂素—C 溶液的配制	87
2.1.6 0.1%明胶溶液的配制	87
2.1.7 LIF 的分装	87
2.1.8 AKP 染色液的配制	87
2.2 山羊 ES 细胞培养液	87
2.3 小鼠及山羊胎儿成纤维细胞饲养层的制备	88
2.3.1 小鼠胎儿成纤维 (MEF) 的分离与培养	88
2.3.2 山羊胎儿成纤维 (GEF) 的分离与培养	88
2.3.3 MET 和 GEF 的继代培养	88

2.3.4 MET 和 GEF 饲养层的制备	88
2.4 胚胎的制备	90
2.4.1 体内受精囊胚	90
2.4.2 体外受精囊胚	90
2.4.3 孤雌激活胚	90
2.5 山羊 ES 细胞的分离与培养	90
2.5.1 ICM 的初次代代培养	90
2.5.2 山羊 ES 细胞的继代培养	90
2.6 ES 细胞的鉴定	91
2.6.1 形态学鉴定	91
2.6.2 AKP 染色	91
2.6.3 核型分析	91
2.6.4 体外分化	91
3 结果	91
3.1 山羊 ICM 的生长行为	91
3.2 不同来源的胚胎对山羊 ES 细胞分离培养的影响	93
3.3 不同饲养层对山羊 ES 细胞分离培养的影响	93
3.4 不同种类血清对山羊 ES 细胞分离培养的影响	95
3.5 不同培养液对山羊 ES 细胞分离培养的影响	96
3.6 山羊 ES 细胞的鉴定	96
3.6.1 形态学鉴定	97
3.6.2 AKP 染色	97
3.6.3 核型分析	98
3.6.4 体外分化	98
4 讨论	100
4.1 胚胎来源及质量对山羊 ES 细胞分离培养的影响	100
4.2 饲养层对山羊 ES 细胞分离培养的影响	100
4.3 血清对山羊 ES 细胞分离培养的影响	101
4.4 细胞因子对山羊 ES 细胞分离培养的影响	101
4.5 山羊 ES 细胞的鉴定	102
5 结论	102
结论	103
参考文献	104
英文摘要	120

山羊胚胎体外生产体系的优化以及胚胎干细胞 分离培养技术的研究

摘 要

本文研究山羊卵母细胞体外培养、体外受精及胚胎体外培养程序的优化，目的是为建立一套完善的山羊胚胎体外生产体系。从而为该技术走出实验室，在实践中得以应用提供理论依据。同时探讨山羊胚胎干细胞的分离培养技术，为核移植、转基因等胚胎工程后技术的应用奠定基础。

试验一研究山羊卵母细胞体外成熟的培养方法，以提高山羊卵母细胞的成熟率。使用微滴法培养，探讨山羊卵母细胞的回收、成熟液的调整对比、添加不同激素、以及不同抗氧化物质等对山羊卵母细胞体外成熟的影响。结果表明，选用胞质均一致密，外围至少有3层以上卵丘细胞包裹的A级卵母细胞，添加浓度为1 $\mu\text{g/ml}$ 的 E_2 、5 μM 的 β -ME，成熟培养27h可显著提高卵母细胞体外培养的成熟率。使用国产绒促激素完全可以代替进口的FSH和LH用于山羊卵母细胞体外成熟培养，在相同效果的前提下可大大降低成本。

试验二研究山羊体外受精条件的优化，为提高体外成熟卵母细胞的受精质量和数量提供理论基础。比较体外受精方法，不同获能物质的影响表明不同精子获能中，肝素效果比较稳定。Percoll法处理精子卵裂率要显著高于上浮法，但是囊胚率和囊胚细胞数并没有提高。上浮法的精子镜检活力要好于Percoll法分离的精子。但是，总体受精率、发育率还很低。

试验三通过优化培养程序，筛选培养液，以建立适合山羊胚胎体外发育的培养体系。通过共培养方法对共培养体系、换液程序、以及不同培养液的研究表明，在山羊胚胎培养中，基础培养液选用配制简单的SOF（CR1也可使用），添加BSA/FCS，并采用正确换液程序，即48h前是SOF+BSA，之后换为SOF+FCS可获得理想的囊胚率和卵裂率。共培养条件下颗粒细胞和输卵管细胞对胚胎的发育并没有明显差异，但就发育率而言，显著优于无共培养体系。由此，说明共培养细胞类型对胚胎发育影响不大，但可以很好地克服胚胎的8~16-细胞阻滞。

试验四利用透射电镜研究山羊体内胚和体外胚的超微结构，旨在对体外胚胎质量及其培养体系进行评价，为进一步提高体外胚胎的质量提供超微结构方面的理论依据。结果表明山羊体外胚胎质量要比体内发育胚差，包含有大量脂滴、畸形线粒体以及空泡化严重、细胞间隙连接较少且松散、核质比下降等。

试验五以体内受精胚、体外受精胚和孤雌激活胚三种不同来源的囊胚为材料，分离山

羊 ES 细胞。比较不同饲养层种类、血清种类以及不同的培养液对山羊 ES 细胞分离培养的影响，筛选出适合山羊 ES 细胞分离培养的条件，将一株 ES 细胞系传至 6 代。分析了贴壁率、ICM 集落形成率以及 ES 细胞传代等指标。研究表明，体内受精胚胎、MEF 饲养层、添加 FCS、细胞因子 LIF 与 IGF-1 联合使用更适合于山羊 ES 细胞的分离培养，使山羊 ES 细胞传 6 代。AKP 染色 ES 细胞呈阳性、核型正常，并进行自发分化可形成神经样细胞、上皮样细胞、成纤维样细胞。

关键词：山羊 卵母细胞 体外成熟 体外受精 胚胎
体外培养 胚胎干细胞 分离 传代

前 言

体外受精技术也称胚胎体外生产技术，是继人工授精、胚胎移植技术之后又一项伟大的胚胎工程技术。它是由卵母细胞体外成熟、精子获能、受精卵体外培养、胚胎移植等程序组成的完整系统。从世界首例试管兔的获得到现在，已有 40 多年的历史。在此期间，多种试管动物、克隆动物、转基因动物等相继出生，胚胎工程技术取得巨大进展。特别是近十年来，胚胎工程后技术显示着发展的巨大活力，如细胞核移植、ES 细胞的建立及 DNA 图谱的构建等技术都大大推动了体外受精技术的发展。随着科技的进步，体外受精技术对于濒危动物和优良家畜品种的后代续繁、打破时间和空间限制进行品种资源保存、国际间品种交流等均具有重大的现实意义和应用前景。

我国是一个山羊生产大国，大约有山羊 1 亿多只，在我国畜牧业中占有重要地位。特别是对于诸如布尔山羊这样的引入品种，目前主要是通过人工授精技术和杂交技术扩繁，繁育速度相对缓慢，难以满足市场和社会需求。如果利用胚胎体外生产技术并结合 MOET 技术，则会快速生产出大量的、品质优良的布尔山羊纯种。

国外胚胎体外生产技术已从实验室转向商品化生产，而我国还仅限于实验室阶段，主要是成功率低。体外生产胚胎不论从形态、质量上都不如体内发育的胚胎，体外胚胎移植产子率低，卵裂球显著少于体内胚。原因是卵母细胞质量差、克隆再程序化不清楚，以及胚胎体外培养体系不完善，导致胚胎质量下降，妊娠率降低，胎儿畸形率高。建立一套完善的胚胎培养体系，是胚胎在体外能够正常发育到囊胚的重要环节。目前国内，对于山羊成体系的、能够在生产实践中推广应用的胚胎体外生产技术还不很成熟。

卵巢卵母细胞生长、发育是一个极其复杂的过程，涉及到多种体细胞和生殖细胞自身。在众多培养体系中，卵母细胞总是被阻滞于减数分裂，发育到一定阶段后获得恢复减数分裂能力，并最终发育成熟。卵母细胞减数分裂能力的重新获得和生长发育是密切相关的。国内外许多学者比较了培养液容量、激素、卵母细胞来源、甚至包括维生素等对山羊卵母细胞的影响。这些结论都表明，能够经体外成熟、体外受精和早期胚胎体外培养发育到囊胚的山羊胚胎比例不高。本文关于如何优化山羊卵母细胞体外培养、体外受精及胚胎体外培养程序作了进一步研究，为建立完善的山羊胚胎体外生产体系提供依据；并探讨山羊 ES 细胞的分离培养技术，为进一步研究核移植、转基因等胚胎工程后技术奠定基础。论文共分六章，第一章为文献综述，介绍哺乳动物卵母细胞体外成熟培养、体外受精、胚胎体外培养及 ES 细胞分离培养研究的发展过程、技术进步以及发展前景和存在的问题；第二章研究如何提高山羊卵母细胞的回收、成熟液调整对比、以及添加不同激素对山羊卵母细胞发育、成熟的影响等作了进一步探讨；第三章分析比较山羊卵母细胞体外受精的不同方法，

优化山羊体外受精的条件，为提高体外成熟卵母细胞的受精质量和数量提供理论基础；第四章通过优化培养程序，筛选培养液，建立适合于山羊胚胎体外发育的培养体系；第五章对山羊体外胚胎和体内胚胎的超微结构差异进行研究，为进一步提高体外胚胎的质量提供超微结构的理论依据；第六章比较不同饲养层种类、血清种类以及不同的培养液对山羊 ES 细胞分离培养的影响，筛选出适合山羊 ES 细胞分离培养的条件，将一株 ES 细胞系传至 6 代，为进一步建立山羊 ES 细胞系奠定基础。

第一章 文献综述

卵母细胞体外成熟 (in vitro maturation, IVM)、精子获能(sperm -capacitation, SC)、体外受精(in vitro fertilization, IVF)、胚胎早期培养(in vitro culture, IVC)及冷冻保存 (freezing conservation, FC) 等是胚胎体外生产 (in vitro production, IVP) 的关键环节。随着哺乳动物胚胎工程技术的深入和商业性胚胎移植技术的迅猛发展, 以及胚胎工程后技术如转基因和克隆动物的相继诞生对卵母细胞和胚胎的需求量日益增加, 建立一套完全在体外条件下生产和保存大量优质廉价卵母细胞和胚胎的技术是非常重要的。

第一节 卵母细胞体外成熟的研究进展

1 哺乳动物卵母细胞体外成熟研究概况

20 世纪 30 年代已有人证明卵母细胞在体外环境下可以成熟^[1]。Pincus 等 (1935) 年从兔卵泡中分离出卵母细胞, 经体外培养使其继续减数分裂而达成熟, 生殖工程研究由此诞生一项新技术——卵母细胞体外成熟培养。它是指在体外卵母细胞恢复减数分裂, 到达第二次减数分裂中期具备受精能力的过程^[2]。卵母细胞体外成熟培养技术是现代哺乳动物体外受精技术和胚胎工程的基础环节^[3]。最早对哺乳动物卵母细胞进行体外培养研究的是德国科学家 Schek 等 (1878) 将兔和豚鼠排卵前的卵母细胞和附睾精子放入相应的子宫液中培养, 发现卵丘细胞分散, 第二极体排出^[4]。此后许多学者对卵母细胞体外成熟培养进行了深入的研究。直到 1959 年, 美籍华人张明觉把体外受精的兔卵裂球移植给受体母兔, 获得了世界上第一胎哺乳类试管动物^[5]。60 年代后, 开始研究哺乳动物卵巢卵泡的分离技术。Edwards 等 (1988) 阐述了卵母细胞在体外恢复和完成减数分裂的百分比和减数分裂的确切过程^[11]。70 年代研究卵巢卵泡体外生长发育和分泌的活动。Zamboni 等 (1972) 利用光学显微镜和电子显微镜对卵母细胞体外培养成熟过程中的细胞外形以及内部超微结构作了细致描述^[6]。国内外许多学者从卵巢组织形态学研究和开发了腔前卵泡^[13]。Nicosia 等 (1975) 用胶原酶建立一套分离兔各级卵泡的技术, 并比较了不同发育时期兔卵泡的特征^[7]。Gandolfi 等 (1988) 通过电镜研究表明, 培养卵泡-卵丘细胞复合体和体内正常生长的卵泡-卵丘细胞具有相似的特征^[8]。80 年代哺乳动物腔前卵泡的研究更加细致, 并开始卵母细胞体外培养体系的建立。Roy 等 (1989) 研究了促卵泡素 (follicular stimulating hormone, FSH)、促黄体素 (luteinizing hormone, LH)、孕酮 (progesterone, P₄) 和雌二醇 (17 β -estradiol, 17 β -E₂) 对腔前卵泡生长和分化的影响^[9]。Eppig 等 (1989) 建立一套完整的小鼠腔前卵泡卵母细胞体外发育、成熟和受精技术, 并获得后代; 同时指出卵母细胞体外培养体系的研究不仅在于一些因子的添加, 更要注意颗粒细胞的发育和功能^[10]。随后 Kishimoto 等 (1988)

又研究了卵母细胞成熟调节机制^[11]，如卵母细胞促成熟调节因子(MPF)^[12]、环磷酸腺苷(cAMP)^[13]、以及c-mos原癌基因^[14]等被认为在减数分裂过程中起重要调节作用。Eppig和Obrien(1996)将来源于原始卵泡的卵母细胞体外培养成熟，并经体外受精、胚胎移植得到后代。

关于羊卵母细胞体外培养研究最早是Edwards(1965)探讨卵母细胞成熟条件及影响卵母细胞成熟的抑制因素^[15]。Crosby等(1981)研究卵泡细胞调节绵羊卵母细胞蛋白质合成的能力。对山羊卵母细胞体外成熟的研究90年代以来作了大量的工作，取得了很大进展^[16]。如体内外不同条件^[17,18]、山羊不同发育时期^[19~23]、不同取卵方法^[24~28]等对卵母细胞体外成熟及发育能力的影响。Smedt等(1994)探讨山羊卵母细胞减数分裂的恢复及形态和功能的变化^[29]。Pawshe等(1996)研究不同成熟处理山羊卵母细胞体外成熟和早期胚胎的发育^[30]。Smedt等(1992)^[31]、Crozet等(1995)^[32]进行不同大小卵泡卵母细胞体外成熟的研究。国内许多研究者集中研究基础培养基、不同激素以及各种生长因子等对卵母细胞发育的影响，不断改进卵母细胞体外成熟培养体系。徐照学等(1998)选用加丙酮酸钠改良TCM199液，提高成熟率^[33]。旭日干(1990)利用羔山羊卵巢卵母细胞进行体外受精和胚胎移植获得产仔效果^[34]；钱菊芬等(1991)用山羊体内成熟卵母细胞进行体外受精，获得了我国首例试管婴儿^[35]；许多研究者探讨了不同培养基对山羊卵泡卵母细胞体外成熟培养的效果^[36~41]；张涌等(1998)研究了不同激素和生长因子及卵泡液对山羊卵泡卵母细胞体外成熟培养的影响^[42]；并探讨了不同温度对山羊卵泡卵母细胞体外成熟培养的影响；研究山羊大腔卵泡卵母细胞、小腔卵泡、小腔卵泡卵母细胞和无腔卵泡卵母细胞体外成熟^[43,44]；进一步对绵羊和山羊卵母细胞体外成熟超微结构和核质成熟进行深入研究^[44~47]。总之，随着哺乳动物体外受精、细胞核移植和外源基因导入等高新技术的不断深入，人们对成熟卵母细胞以及哺乳动物胚胎的需求量日益增加，卵巢内丰富卵泡资源是胚胎工程迅速发展的基础，如动物的人工繁殖、转基因动物的生产、濒危物种的保存以及遗传物质资源库的建立等，这些技术的应用都离不开卵母细胞这一特殊的载体。通过卵巢卵母细胞体外成熟获取大量成熟卵母细胞，然后进行体外受精体外生产胚胎愈来愈引起人们的重视^[48]。在已有成绩的基础上，为进一步研究卵母细胞体外成熟培养提供卵母细胞发育动力学模型，为最大限度地开发卵泡库资源提供理论依据。

2 哺乳动物卵泡卵母细胞发生、发育和成熟规律及调控机理

2.1 哺乳动物卵泡卵母细胞的发生

哺乳动物在胚胎期性别分化后，雌性胎儿的原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs)便分化为卵原细胞。卵原细胞经过多次有丝分裂，以一分为二的方式增殖成许多初级卵母

细胞，进一步发育，被卵泡细胞包被而形成原始卵泡。动物在出生前，卵巢上便含有大量的原始卵泡，构成原始卵泡库^[4]，被认为是雌性生殖资源的储备库，其数量因物种和发育阶段不同而异，小鼠约 1 万个，人约 30~40 万个，家畜约几百万个^[3]。出生后随着年龄的增长，这些储备资源不断减少，多数卵泡中途闭锁而死亡，少数卵泡发育成熟而排卵。据估计，真正能够发育到排卵阶段的卵泡仅占原始卵泡总数的 0.1%~0.2%，仅为原始卵泡库中极其有限的一小部分。比如，母犊出生时卵巢上的原始卵泡有数百万个^[49]；出生后有 15 万个卵泡；10~14 岁时有 5 万个卵泡；到 20 岁时，只有 6000 个卵泡。牛的生理成熟期是 1.5~2.0 岁，妊娠期较长，平均为 282 天，推断牛的终生繁殖年限是 13.5 年，牛又是单胎动物，按照自然繁殖率，牛终生可用卵母细胞的数量最多 15 个左右（偶而怀双胞胎），其余的都退化、闭锁而死亡。每一个最终排出的卵泡都要经历三个阶段：第一阶段生长卵泡的发育：所有的生长卵泡中，有一部分生长卵泡率先开始快速发育过程；第二阶段是选择：在率先发育的卵泡中，也只有其中的一部分被选择继续发育，并最终导致优势卵泡的出现。优势卵泡的发育和选择可能与对促性腺激素的反应能力有关；最后是优势化：在被选择的卵泡中，最终有一个（或几个）能够快速发育，直到排卵，而与之同时发育的其他卵泡则被抑制。如果将卵巢中的未成熟卵母细胞开发利用，则未成熟卵母细胞体外培养成熟技术必将成为研究卵母细胞发育动力学的一个有利工具，在提高优良母畜的利用率，为制作转基因动物，克隆动物，研究生殖机理及胚胎发育规律等方面提供大量的卵源^[50]。

2.2 哺乳动物卵泡卵母细胞发育及成熟的一般过程

雌性动物在胚胎期，增殖后的卵原细胞成为初级卵母细胞。到出生前后，卵原细胞停止增殖，进入第一次减数分裂前期。之后，经细线期、偶线期、粗线期发育到双线期。在双线期后期，染色质高度疏松，外包完整的核膜，称为核网期（dictyate stage），此时的细胞核又称为生发泡（germinal vesicle, GV）。在不同动物，卵母细胞将在这一时期休止数日至数年不等。这些卵母细胞被一层扁平上皮细胞包围，成为原始卵泡（Primordial Follicles, PF）。卵泡不断生长，但卵母细胞仍处于 GV 期，一直到性成熟前。性成熟后，在促性腺激素或其它因子的作用下，这些初级卵母细胞才有可能恢复减数分裂，发生生发泡破裂（germinal vesicle breakdown, GVBD），排出第一极体，并发育到第二次减数分裂中期（M II），成为一个成熟卵母细胞，并从卵巢中释放出来。如果不受精子或其它因素的刺激，将维持在 M II 期数小时，直到退化。卵母细胞发育过程中，细胞质中各细胞器发生了许多重要的变化。总的变化规律为：大多数细胞器最初分布于近核区，随着卵母细胞生长，线粒体、高尔基体、粗面内质网、皮质颗粒等细胞器不断丰富和增多，并逐渐向皮质区迁移，在细胞中央形成不含细胞器的“透明区”；卵母细胞成熟后，皮质颗粒排列在质膜下，而其它细胞器又向卵母细胞中央迁移，最终高尔基体和内质网消失，线粒体分散在胞质中^[51]。

根据卵泡卵母细胞生长、成熟过程的形态学特征可以把哺乳动物卵母细胞生长过程分为以下四个阶段：

2.2.1 减数分裂启动及核网阻滞期

原始卵泡时，卵泡膜还没有形成，卵泡颗粒细胞外周有一层基底膜，又称基底层(basal lamina)。卵泡成腔后基底膜(层)外又包裹卵泡膜。卵泡壁由三类细胞组成即外膜、内膜和颗粒层，外膜细胞和内膜细胞统称为膜细胞。Irving 和 Rodgers (2000) 观察了牛腔前及有腔卵泡的卵泡壁，有腔卵泡内颗粒层基底细胞形态一致，圆形或柱状，直径小于 4 mm 卵泡中柱状基底颗粒细胞和圆形基底颗粒细胞的比例相同^[52]；而更大些的卵泡则只有圆形基底颗粒细胞。卵母细胞质膜直接与卵泡的单层上皮细胞膜相连，形成桥粒连接。壁层颗粒细胞、卵丘细胞和卵母细胞之间存在间隙连接，从而使三者共同形成一个结构和功能上的合胞体^[53, 54]。细胞核的变化特点：核为圆形，体积较大，直径超过卵母细胞直径的一半，含一个核仁，由颗粒染色质丝不规则缠绕而形成的网状并有空泡，表明有一定的转录活动。细胞质的变化特点：细胞质是细胞内产生能量的细胞器，是细胞内氧化磷酸化产生 ATP 的场所，有“动力工厂”之称。牛、羊初级卵泡阶段，线粒体主要分布在卵母细胞近核区，为圆形，嵴很少或没有^[55]。但猪原始卵泡中有大量线粒体存在，且分散在整个细胞质中^[56]。高尔基体分布于近核区，较为发达，由扁平囊膜和小泡构成，线粒体数量多为圆形。猪原始卵泡卵母细胞中有较多的内质网，不规则扁圆形，与线粒体平行分布，粗面型内质网(RER)和滑面型内质网(SER)的组成比为 1:3。发育早期的牛和山羊卵母细胞也有较多 RER，为细长形，其上有较多核蛋白附着；滑面内质网数量较少，表明细胞的代谢活动主要集中在核区。山羊卵母细胞外包单层颗粒细胞时，即有皮质颗粒样的圆形小体出现，猪此期也有极少数游离的皮质颗粒出现在近核区^[57]。

2.2.2 卵母细胞生长期

核网期的卵母细胞在一定因素的诱导下，进入生长期，其体积迅速膨大，几乎达到成熟时的体积。细胞核的变化特点：体积变大，称为生发泡，核仁空泡化程度更高，同时出现了纤维中心，说明核转录活动非常活跃。生发泡在生长过程中逐渐靠近质膜，卵母细胞核停止转录活动，并发生核仁致密化。致密化的核仁主要是母源 RNA 的贮存场所^[58]。这时的核获得完成减数分裂的能力，直径为卵母细胞直径的 1/3，称为“获能卵母细胞”^[59]。细胞质的变化特点：高尔基体向质膜方向扩散并逐渐退化，形态不规则。线粒体数目增多，并逐渐向皮质区移动，由圆形逐渐变为带帽线粒体。在生长过程中，包围卵母细胞外的上皮细胞由单层变为多层数目不断增加并转变为立方颗粒细胞，卵母细胞质膜外出现透明带并逐渐加厚，卵质膜上出现短小的微绒毛，颗粒细胞膜与卵母细胞以微绒毛的形式伸入透明带相互嵌联。直径为 2 mm 的牛卵泡和 0.5~1 mm 的山羊卵泡中的卵母细胞，透明带内的微绒毛开始缩短变粗，并逐渐从透明带退出。当卵母细胞外包 2~4 层颗粒细胞时，皮质

颗粒渐增，并逐渐向皮质区迁移，随着卵母细胞进一步发育，皮质颗粒明显增多。

2.2.3 减数分裂恢复期

卵母细胞完成快速生长后，体积接近成熟卵母细胞，其物质贮备也达到一定的丰度^[52]，重新恢复减数分裂。卵母细胞减数分裂恢复后不久，细胞间的间隙连接丢失，一些大分子的代谢产物和信息分子再也不能在体细胞和卵母细胞间穿梭交流。细胞核的变化特点是：GVBD 发生和中期板的形成。对于体外成熟培养的卵母细胞，由于卵泡来源不同，在培养后 3~12 小时，陆续有 GVBD 发生^[60]。染色体从核中放出，发生第一次减数分裂，释放第一极体并进入第二次减数分裂，停滞于 M II 期。染色体形成中期板，其长轴与细胞膜表面平行。这一过程的完成标志着卵母细胞核成熟完成。核仁的致密化伴随着 rRNA 合成的急剧下降，使核仁由 RNA 的合成场所转变为 RNA 的贮存场所^[61, 62]。在卵母细胞发育过程中，核孔越来越明显，密度增加，而核周隙越来越难以分辨^[63]。细胞质变化的特点是：细胞器在细胞质中均匀分布，线粒体为带帽状，其一端与滑面内质网相连，向胞质中央迁移扩散，三五成群分布于整个细胞质中^[64, 65]。小鼠和猪卵母细胞的线粒体也由核周围逐渐移向皮质，成熟时，分散于胞质中，但未发现帽状线粒体^[66, 67]。高尔基体消失，主要是形成皮质颗粒并为卵质膜微绒毛的形成提供膜成份。到卵母细胞成熟时，RER 消失，而 SER 增多，且囊泡膨大，形态不规则，与线粒体联系密切。细胞膜主要特征是：在非极体区形成大量微绒毛。尚未完全成熟的卵母细胞，其微绒毛全部倒伏在卵母细胞的表面；完成成熟时，其微绒毛直竖，垂直于细胞膜表面。如牛卵母细胞在培养 15~18h，部分微绒毛已经竖起，而在培养 22~24h 达高峰^[68]。当卵母细胞成熟时，皮质颗粒排列在质膜下，被认为是卵母细胞成熟的典型特征之一。

2.2.4 卵母细胞在 M II 期的停滞

卵母细胞发育到 M II 期时停滞下来。在这一时间段能够进行受精，称为卵母细胞可受精寿命 (fertilizable life span)。卵母细胞从阻滞中解脱出来完成第一次减数分裂，停滞在 M II 期，卵母细胞成熟了，即具有受精能力。在生长期前，核的转录处于主要地位，合成了大量的 mRNA 和 rRNA 等，为快速生长奠定信息基础。而在生长期，卵母细胞的活动以细胞质为主，即表现为细胞体积迅速膨胀，这就为卵母细胞蛋白质的合成及营养物质的贮备提供良好的条件。一个成熟小鼠卵母细胞，其 RNA 可达 0.4~0.6 ng，为正常细胞的 800 倍，蛋白质的含量为正常细胞的 50 倍，同时还贮备卵黄、脂滴等大量营养物质。

2.3 哺乳动物卵母细胞体外成熟培养超微结构变化

Yamada 和 Porter (1957) 首次对大鼠和小鼠卵母细胞超微结构进行描述。家畜上已在牛^[64]、羊^[69]等卵母细胞体内和体外发育的超微结构作了研究，Suzuki 等 (1981) 对人体外成熟卵母细胞超微结构也进行了报道^[70]。对于山羊卵泡卵母细胞体内、外成熟前后超微结构

变化，国内外学者也作了大量的研究工作。谭景和等报道，牛、绵羊及山羊的卵母细胞内有带帽线粒体分布，并认为带帽线粒体是反刍动物卵母细胞成熟的特征之一^[58]。钱菊芬等(1991)对山羊卵母细胞体外成熟前后超微结构的变化研究表明，排卵后2~4小时的输卵管卵母细胞，MII纺锤体已发生90°的旋转，其长轴已与质膜呈垂直状，这种变化对受精后第二极体的释放非常有利^[71]。刘建民等在牛上得到同样结果^[72]，钱菊芬等(1994)研究认为，微绒毛由粗短变细长，由倒伏于卵质膜表面而后竖起是胞膜充分成熟的标志^[68]。牧人等(1996)还对羔山羊卵巢卵母细胞超微结构变化进行研究^[73]。Rajikin等(1994)^[74]、Huynh等(2003)^[75]研究发现三层以上卵丘卵母细胞，培养前透明带已经形成但环带现象不明显；脂滴出现但未见线粒体；培养20h后，透明带分化成或薄或厚的区域，卵周隙中出现膜结合的电子透明团块，线粒体已充分发育，并通常与扩张的内质网在胞质中均匀分布，皮质颗粒分布在周边，4h后，大量线粒体成为带帽状。结果表明培养24h卵母细胞就可获得充分发育。刘喆等(2000)研究表明：大、中两类卵泡经体外培养细胞质成熟较好，但其线粒体的分布与体内成熟卵有差异，说明当前培养体系并不能支持胞质充分成熟，从线粒体、皮质颗粒、微绒毛、脂滴等超微结构来看，裸卵及卵丘细胞已扩散卵母细胞为退化的卵母细胞，且裸卵的退化程度更高^[46]。Vanden等(1998)对离体牛腔前卵泡超微结构和活力进行评定，表明机械分离条件适于较大的腔前卵泡^[76]。同时表明，超微结构研究可客观评定体外培养生长卵泡，特别是其卵母细胞的质量，并为良好培养体系的确立提供可靠的依据。对腔前卵泡的超微结构研究表明^[77, 78]，山羊腔前卵泡体外培养7d，表现微绒毛较小，高尔基体、皮质颗粒等细胞器大多分布于皮质区，细胞核迁移到质膜附近，核仁纤维中心明显增多变大；培养16d，卵母细胞的超微结构表现不同的发育阶段。大多数卵母细胞培养结束后，未观察到皮质颗粒在质膜下的分布现象，有的卵母细胞线粒体仍为椭圆形，板状嵴，细胞器迁移不完全正常。卵泡的外周由两层纤维状的结构组成的基膜覆盖，基膜与颗粒细胞相连。这些发现为腔前卵泡的鉴定提供了超微结构上依据。Yu等(1999)用透射电镜研究仓鼠卵巢发育状况^[79]。不同剂量胰岛素影响卵母细胞的体外发育速度，高剂量胰岛素延缓初级卵泡的形成，并诱导具有较大卵母细胞的原始卵泡的形成。

2.4 哺乳动物卵母细胞生长和成熟过程的分子调控机理

卵子在动物体内成熟过程中，不仅保存其自身所需的物质，还要积累更多的营养物质，作为胚胎发育时的物质贮存。卵母细胞的研究多集中在卵母细胞成熟调控机制方面，即卵母细胞成熟启动调控、成熟分裂的两次阻滞和恢复调控。卵母细胞成熟过程实质是一个复杂减数分裂周期调控过程，许多分子参与调控。

2.4.1 成熟分裂阻滞

哺乳动物卵母细胞的成熟分裂被阻滞于第一次成熟分裂前期的核网期，直到接收到卵

泡成熟和排卵的信号，才能完成减数分裂，这种现象称成熟分裂阻滞^[80]。在胎儿早期阶段，如果卵母细胞没有被卵泡细胞包围，这个卵母细胞就会在卵巢内消亡^[81]。随着卵泡发育，卵母细胞第一次成熟分裂停止，但体外培养时，卵母细胞继续发育，表明卵泡液中存在可以抑制卵母细胞成熟的因子，这种成分叫做卵母细胞成熟抑制因子（oocyte maturation inhibiting factor, OMI）。这些抑制因子可能来源于卵巢颗粒细胞或卵泡壁细胞并分泌到卵泡液，是一些低分子量的热稳定性多肽、环腺苷酸或卵巢激素，它们没有种属特异性。很多哺乳动物卵母细胞成熟都受到环磷酸腺苷（cyclic adenosine monophosphate, cAMP）和嘌呤类物质的抑制^[82]。

cAMP 及其类似物 dbcAMP（dibutyryl cyclic AMP, 二-丁酰基环磷酸腺苷），腺苷酸环化酶及其活化物都能抑制 GVBD 的发生。cAMP 类似物（如 8-Br-cAMP）或磷酸二酯酶（PDE，一种降解 cAMP 的酶）抑制剂是通过阻止细胞内 cAMP 的降解，从而抑制 GVBD 的发生^[83]。Mattioli 等（1994）研究表明，用 dbcAMP、PDE 抑制剂或 IBMX（isobutyl methylxanthine, 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤，它是一种 cAMP 磷酸二酯酶抑制因子，通过使 cAMP 降解减少来提高 cAMP 浓度）维持卵母细胞于 GV 期，并用 cAMP 依赖性蛋白激酶（PKA）抑制剂对卵母细胞进行显微注射，就会发生成熟分裂恢复^[84]。cAMP 是调节卵母细胞成熟的一个关键因子，卵母细胞内高浓度的 cAMP 是维持卵母细胞 GV 抑制状态的重要因素^[85]。cAMP 对卵母细胞成熟的抑制作用是通过依赖于 cAMP 的蛋白激酶来调节的，并涉及到一些特殊蛋白质的磷酸化和去磷酸化^[86]。Choi 等（1991）^[87]、Gorens 等（1994）^[88]表明，小鼠和大鼠中成熟促进因子（mature promoting factor, MPF）被激活，其诱导减数分裂的能力就不受 cAMP 水平的影响。cAMP 是 p34^{cdc2} 翻译后调控因子，（其中 p34^{cdc2} 是细胞分裂周期基因（cell division cycle, cdc）蛋白），抑制 p34^{cdc2} 的磷酸化。当卵母细胞内 cAMP 水平下降时，cAMP 依赖蛋白激酶活性下降，细胞内磷酸化和去磷酸化的水平发生相应的改变，激活酪氨酸磷酸酶。催化发生 p34^{cdc2} 去磷酸化，使其活化，进而使 RNA 聚合酶 II 等多种蛋白发生磷酸化，这些物质分别在转录和翻译水平上控制减数分裂周期，而使卵母细胞恢复减数分裂。Downs 等（1995）提出小鼠卵母细胞和卵丘细胞存在有不同形式的蛋白激酶 A（protein kinase A, PKA）：卵母细胞中存在 I 型 PKA，激活型的 I 型 PKA 能抑制卵母细胞的减数分裂；卵丘细胞内存在 II 型 PKA，激活型的 II 型 PKA 能诱导卵母细胞减数分裂的恢复，在牛和大鼠均有类似结果的报道^[89]。FSH 诱导猪卵母细胞成熟首先刺激卵丘细胞内 cAMP 的迅速上升，进而诱导卵母细胞内 cAMP 峰的产生，卵丘细胞开始扩展，随后卵母细胞内 cAMP 下降，卵母细胞克服抑制，开始恢复减数分裂，这说明在生理条件下卵丘细胞内 cAMP 峰的产生和下降是卵母细胞成熟的关键。

嘌呤类物质。如次黄嘌呤（HX, hypoxanthine）和腺苷，以毫摩尔浓度添加在维持卵母细胞成熟分裂阻滞的培养基内。尽管对牛卵母细胞的抑制作用有限，但许多动物的卵母细

胞自发性成熟可被抑制，如小鼠卵母细胞注射后阻止 GVBD^[90]。次黄嘌呤对卵母细胞成熟的抑制作用是通过防止卵母细胞内 cAMP 水平降至抑制阈值以下来完成的，绵羊卵母细胞体外培养时，大部分卵母细胞在开始培养后 6~8h 发生 GVBD^[91]。李朝军等报道腺嘌呤对体外小鼠卵母细胞减数分裂起到抑制作用。次黄嘌呤和腺苷在维持成熟阻滞方面具有协同作用，直接与 cAMP、PDE 活性的抑制作用及成熟分裂阻滞水平的 cAMP 升高有关。次黄嘌呤和腺苷的抑制作用是可逆的、无毒性的。次黄嘌呤能够可逆地抑制小鼠、猪卵丘卵母细胞复合体中卵母细胞的体外自发成熟，并且该作用具有剂量依赖性。此外，巯基乙酸（TGA）可抑制体外培养卵母细胞的 GVBD，但对小鼠体内卵母细胞 GVBD 没有影响，巯基乙酸可抑制卵母细胞第一极体的释放，破坏卵母细胞的成熟，降低卵母细胞受精能力。Forskolin 制剂或激素 FSH 也能维持减数分裂阻滞。IBMX 是通过抑制磷酸二酯酶活性来抑制卵母细胞成熟；FSH 是通过激活腺苷酸环化酶活性来升高细胞内 cAMP，从而抑制卵母细胞成熟。

OMI 是由颗粒细胞释放到卵泡液中起作用，不同 OMI 抑制机理有差异。如牛卵泡液抑制小鼠卵母细胞减数分裂，但对于牛卵母细胞的抑制作用是无效的，或只是暂时的^[92]。颗粒细胞单层可中度抑制牛卵母细胞成熟分裂^[93]。颗粒细胞的阻滞作用并不一定需要和卵母细胞直接接触，培养时加入颗粒细胞，生发泡破裂被抑制，但两种细胞直接联系能增强阻滞作用。cAMP 并非对所有卵母细胞生发泡抑制都起关键性的作用；而且并非所有减数分裂的恢复都依赖卵母细胞内环核苷酸水平的下降。其它的环核苷酸也参与了成熟分裂的调控，如 cGMP 及其类似物等同样能抑制卵母细胞的自发性成熟，GVBD 与卵母细胞 cGMP 水平的下降有关^[94]。霍乱毒素能升高绵羊卵母细胞 cAMP 水平，但不抑制自发性成熟。有些家畜升高 cAMP 水平对阻止体外自发性成熟无特别影响。例如，在牛需要毫摩尔浓度 dbcAMP 或 IBMX 才能看到对卵母细胞成熟的抑制作用，该作用却不能在整个培养期间维持。卵丘细胞与卵母细胞之间存在着缝隙连接(gap junction)，能允许一些小分子物质通过，颗粒细胞与卵丘细胞产生 cAMP 通过缝隙连接进入卵母细胞内，使卵母细胞的成熟分裂停滞。

cAMP 或嘌呤类物质对 GVBD 所需要的物质（包括蛋白合成或修饰）的影响过程存在着种属差异^[95]。cAMP 类似物 bdcAMP、8-Br-cAMP 等对卵母细胞或其它细胞的作用与细胞内 cAMP 不同，且培养基中血清、激素以及生长因子等也会影响 cAMP 及其类似物的作用。这会导致 cAMP 及其类似物对不同家畜卵母细胞体外成熟抑制作用不同。Moor 等（1985）报道细胞内 cAMP 浓度增加并不能抑制绵羊卵母细胞成熟^[96]。除 cAMP 和嘌呤类物质外，如缪勒抑制物（Mullerian inhibiting substance, MIS）等对成熟分裂也有抑制性调控作用。

2.4.2 卵母细胞生长的调控

卵母细胞生长表现为卵母细胞自身体积的增加和外部颗粒细胞的迅速增殖和分化。研

研究表明, FSH 的存在及基础水平的 LH, 可以启动卵母细胞进入生长期, 而外部颗粒细胞增殖分化是卵母细胞自身体积增大的基础。生长分化因子(growth differentiation factor, GDF-9, 卵母细胞内产生)及其 mRNA 可诱导颗粒细胞的增殖与分化。颗粒细胞一旦开始增殖分化, 就分泌大量细胞因子, 如胰岛素样生长因子(IGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、酸性成纤维细胞生长因子(aFGF)、转化生长因子 α 和 β (TGF- α 和 TGF- β)、白细胞介素-1 和-6 (IL-1, IL-6)、肿瘤坏死因子(TNF-9)、干扰素(LFN-r)及抑制素、活化素等^[97], 它们对卵母细胞的生长起决定作用。首先是 FSH 和 LH 及 GDF 诱导卵母细胞外颗粒细胞的增殖分化, 然后增殖的颗粒细胞产生各类细胞因子, 促使卵母细胞生长。FSH 直接调节和影响细胞因子分泌, 细胞因子主要在卵泡内部发挥作用, 因此, FSH 通过影响细胞因子, 达到对个别卵泡的生长调节^[52]。

2.4.3 成熟分裂恢复

2.4.3.1 哺乳动物卵母细胞成熟分裂恢复的两种假设

在动物体内, 卵母细胞减数分裂的恢复 (meiotic resumption), 发生于排卵前葛拉夫氏卵泡、促性腺激素高峰。而成熟分裂的诱导是促性腺激素与卵泡细胞相结合的结果。诱导减数分裂恢复的机理有两种假设即: 抑制性输入中断和正向刺激。

卵巢卵泡是一个功能性合胞体, 由代谢上相互偶联的体细胞与卵母细胞组成, 代谢上的偶联是通过间隙连接实现的。OMI 抑制卵母细胞减数分裂的恢复, 其大小适于通过间隙连接传输, 对于维持生发泡期具有重要的调控作用。卵母细胞要从阻滞中解脱, 需要一个 LH 高峰, LH 刺激卵母细胞和卵丘细胞间不再偶联, 使颗粒细胞和卵母细胞的联系中断, 从而解除 OMI 对卵母细胞成熟的阻滞, 使卵母细胞完成减数分裂而成熟^[52]。这种联系的丧失会中断抑制性物质, 如 cAMP 的流入, 间接引致成熟分裂恢复^[82]。

大鼠卵丘-卵母细胞复合体间隙连接形态学的变化与成熟分裂的重新启动有关, 但不能证实成熟过程中有因果间的作用。在小鼠体内卵母细胞减数分裂的恢复不是通过抑制性输入的假设机制来调控的, 而是通过促性腺激素即: 正向刺激诱导 GVBD。在 hCG 诱导 GVBD 时, cAMP 水平在卵丘-卵母细胞复合体是升高的, 在卵母细胞和卵丘细胞间的偶联没有明显的减少。促性腺激素刺激导致某种正向因子的产生, 它作用于卵母细胞, 诱使 GVBD 发生。

根据正向刺激的机理推测, 可能是 Ca^{2+} , 它的分子量小于 2kDa。卵母细胞内 Ca^{2+} 增加能刺激成熟分裂阻滞的卵母细胞发生 GVBD。早在 80 年代有人证明, GVBD 的发生需要细胞质中一定的 Ca^{2+} 浓度。Carroll 和 Swann (1992) 发现小鼠卵母细胞减数分裂过程中存在着 Ca^{2+} 的自发波动现象 (Ca^{2+} , oscillation), 认为这种波动和卵母细胞的胞质成熟有关^[98]。Deng 等 (1998) 报道通过激光共聚焦显微镜证明, 小鼠卵母细胞减数分裂恢复过程有钙离

子的自发释放波^[99]。用 Ca^{2+} 载体 (IA23187) 处理卵母细胞,可增加 Ca^{2+} 浓度,逆转 dbcAMP 对自发性成熟的抑制作用,或者刺激卵泡包被的卵母细胞成熟。FSH 可以协同 LH 解除卵母细胞在核网期的阻滞,而且 LH 对卵泡包被的大鼠卵母细胞成熟的促进,也依赖于外部 Ca^{2+} 浓度。细胞外 Ca^{2+} 螯合剂或 Ca^{2+} 摄入抑制剂已证明能阻止自发性成熟。

Ca^{2+} 作用的部位是钙调素,因为该蛋白的抑制物能抑制小鼠卵母细胞成熟。孙青原等 (1994) 研究表明,一定浓度的 Ca^{2+} -CaM 复合体抑制剂能抑制 GVBD 的发生, Ca^{2+} 浓度的升高是恢复减数分裂的一个不可缺少的中间过程, Ca^{2+} 的存在加强 MPF 对微管系统形成的促进作用^[100]。显微注射三磷酸肌醇(IP_3)能克服 IBMX 对牛卵母细胞的成熟分裂阻滞, IP_3 能够引起细胞内某些贮存的 Ca^{2+} 的释放^[101]。 Ca^{2+} 的许多活动是通过钙调素来调节的。钙调素是 Ca^{2+} 的重要受体,其本身无活性,当它与 Ca^{2+} 结合,引起构象发生变化,就成为有活性的分子,调节有关酶的活性,如腺苷酸环化酶、鸟苷酸环化酶、钙依赖性磷酸二酯酶, Ca^{2+} -ATP 酶、磷酸化酶及钙依赖性蛋白激酶等。因此,细胞内 Ca^{2+} 对成熟分裂恢复是必要的。

能量代谢产物是第二种可能的正向调节物。受 dbcAMP 阻滞并由卵丘细胞包被的卵母细胞,其配体诱导的成熟依赖于葡萄糖的摄取和代谢,去掉培养基中的葡萄糖或用 2-脱氧葡萄糖(一种糖酵解抑制剂)代替葡萄糖,则会抵消 FSH 对 GVBD 的诱导。在含葡萄糖的培养基中添加根皮素(一种促进葡萄糖扩散的抑制剂),也能阻止葡萄糖摄取。从而阻止对 FSH 的成熟分裂应答。此外,丙酮酸、ATP 等能量代谢产物都与成熟分裂的恢复密切相关。

2.4.3.2 成熟促进因子与成熟分裂恢复的关系

成熟促进因子(maturation promoting factors, MPF)最早在两栖类动物发现。Masui 和 Markert (1971)^[102], Smith 和 Ecker (1971)^[103]报道,将激素诱导成熟的蛙卵细胞的细胞质注射到蛙卵母细胞中,可引起 GVBD,向分裂期转化并稳定在分裂中。Masui 和 Markert 将成熟蛙卵中能促进卵母细胞成熟的成分称为成熟促进因子(MPF)。M 期颗粒细胞或处于减数分裂成熟状态的卵母细胞,用它们的提取液显微注入未成熟、但有成熟分裂能力的卵母细胞内以后,可刺激 GVBD,这些提取液的活性成分是 MPF,是 M 期的正常诱导物。从遗传角度研究并命名细胞分裂周期(cell division cycle, cdc)基因,并阐明 cdc 基因激活顺序,其中以 cdc2 基因最为重要,他们发现酿酒酵母的某些突变株中,细胞周期的几个特定点可被阻断,在这些突变株中,每个突变基因的产物与通过细胞周期的各特定点有关。美国学者 Maller 等 (2001) 证明 cdc 基因产物与 MPF 之间的关系,他们首次纯化 MPF,并推断它有两种蛋白质成分^[104]。MPF 是调节卵母细胞成熟的核心因素,广泛分布于酵母、两栖类、非脊椎类和哺乳动物中分裂活跃的细胞中,为细胞周期蛋白 B (cyclin B) 与细胞分裂周期控制基因蛋白 (cell division cycle, p34^{cdc2}) 组成的复合体, cyclin B 是 MPF 的调节亚基,

p34^{cdc2} 是 MPF 的催化亚基。在未成熟的卵母细胞中显微注入少量 MPF，便可引起 GVBD。MPF 在未成熟的卵母细胞内以无活性的磷酸化状态存在，在某些信号的催化作用下，MPF 催化亚基 p34^{cdc2} 的酪氨酸去磷酸化后，MPF 被激活，可以启动卵母细胞的减数分裂。p34^{cdc2} 在细胞周期内间断存在，它在 S 期前期开始合成，在 M 期后消失，因此，MPF 的活性随着 cyclin B 的合成与消失而呈周期的变化，其主要作用是促进 GVBD 发生和减数分裂完成。MPF 具有自动催化扩增功能，Taieb 等 (1997) 向胞质内注射 cyclin B 或 cyclin A，与胞质中的 cdc2 形成复合体，当达到阈值时，促进 MPF 前体激活，导致 MPF 水平升高。MPF 总是在 M 期达到高峰^[105]。牛卵母细胞体外成熟过程中，MPF 存在两次高峰。一次在培养后 12~14h，这一时间正是 M I 期；第二次高峰在 20~24h，即 M II 期。暴露于 MPF 中的小鼠精原细胞可以完成减数分裂，暴露于 MPF 中的原始卵母细胞(双线期早期的卵母细胞)也可以发生减数分裂，并有纺锤体形成，所以，MPF 主要功能是促进微管系统和减数分裂纺锤体的形成。Eppig 等 (1996) 报道，在 GVBD 后小鼠卵母细胞合成大量 cyclin B，以提高 MPF 水平，使其进入 M I 期并继续成熟到 M II 期^[106]。在细胞周期中，p34^{cdc2} 没有量的变化，只是通过酪氨酸的磷酸化和去磷酸化而发生活性变化，当细胞从 G₂ 期向 M 期过渡时，p34^{cdc2} 与合成的周期素 B 结合，使 p34^{cdc2} 去磷酸化，恢复其激酶活性；同时周期素 B 磷酸化，有活性的 MPF 产生，细胞从 G₂ 期进入 M 期。MPF 作用于核纤层蛋白(nuclear lamins)，与核膜破裂及重组有关；并作用于 H₁ 组蛋白，H₁ 磷酸化后，能使染色体更紧密地超聚在一起。分裂后期，周期素 B 降解，MPF 失活。卵母细胞一系列的磷酸化/去磷酸化反应影响着 MPF 的活性状态，并决定着生发泡期卵母细胞是维持阻滞在核网期，还是逐步进入 G₂/M 过渡期。

细胞静止因子 (cytostatic factor, CSF) 是卵母细胞从 G₂ 期进入 M 期后停滞在 M 期的中期，即停留在第二次成熟分裂中期 (M II 期) 中起关键作用的物质，Masui 等 (1991) 通过将成熟而未受精的蛙卵细胞的细胞质显微注射到 2-细胞期的卵裂球中发现 CSF 对 Ca²⁺ 很敏感，其活性随卵母细胞受精而消失，CSF 对 MPF 活性起稳定作用^[107]。原癌基因 c-mos 编码一种 Ser/Thr 蛋白激酶，c-mos 在脊椎动物生殖细胞中高效表达。CSF 是原癌基因 c-mos 的产物，CSF 不仅能够使 cyclin B 磷酸化，进而使 p34^{cdc2} 活化，产生有活性的激酶，使细胞从 G 期进入 M 期；而且能维持 cyclin B 磷酸化，使它不被降解，从而维持 M 期激酶的活性，阻止细胞离开 M 期，使它停留在 M 期中期^[108]。原癌基因 c-mos 使 MAPK 和 MPF 的磷酸化保持高水平，并且通过 MAPK 来稳定 MPF 和 M II 期的停滞。在卵母细胞受精后，恢复有丝分裂，细胞内 Ca²⁺ 浓度迅速升高，致使 CSF 消失，不再回升。CSF 有维持 cyclinB 不被降解的作用，一旦 CSF 消失，cyclinB 被降解，MPF 活性消失，则细胞离开 M 期。

2.4.3.3 MAP 家族对成熟分裂恢复的作用

MAP(microtubule associated protein, 微管辅助蛋白; 或 mitogen activated protem, 有

丝分裂活化蛋白)是微管与纺锤体中的一种重要组成成份,同时也是丝氨酸-苏氨酸激酶。MAP 可以促进减数分裂的恢复。首先 MAP 是一种微管辅助蛋白,是微管与纺锤体的一个重要成份,因此,它的参与是恢复减数分裂的一个重要条件。同时,由于 MAP 本身又是一种丝氨酸-苏氨酸激酶,它能使 MPF 特殊位点上的氨基酸磷酸化,从而调节 MPF 的活性,达到对减数分裂过程的调节。此外,MAP 的一个重要作用是能使 MPF 的底物在 MAP 调节下发生与 MPF 调节下相同的磷酸化作用,这就保证在第一次减数分裂完成后,MPF 消失的情况下,由 MAP 代替其磷酸化作用,从而使卵母细胞在 M I、M II 之间不会因为 MPF 失活而发生停留,这正是第一次减数分裂与第二次减数分裂之间没有停息间隔的原因。由于 MAP 本身是一种激酶, cyclin B 也是一种酶性蛋白,它们的活性均受到蛋白激酶 (PK) 的影响。如 MAP 发挥作用的条件是酪氨酸激酶对其特殊部位酪氨酸的磷酸化。

MAPK 叫丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPK), 又称细胞外信号调节蛋白激酶 (extra cellular signal regulated protein kinase, ERK), 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶, 其家族分子量在 40~46kDa 之间, 哺乳动物卵母细胞中 MAPK 存在 44kDa 的 ERK₁ 和 42kDa 的 ERK₂ 两种形式。是激素、生长因子、细胞因子等细胞外信号的中心传导物。MAPK 在体细胞中普遍表达, 是调节细胞周期的主要信号分子之一。细胞周期中减数分裂主要由蛋白激酶磷酸化/去磷酸化级联控制^[109, 110], 其中 MAPK 级联在卵母细胞减数分裂成熟中起重要作用, 它的激活参与哺乳动物卵母细胞的成熟以及受精过程。MAPK 级联在卵母细胞成熟和受精中的作用已在哺乳动物作了大量研究^[111~116], 表明其在卵母细胞成熟、M II 阻滞等方面均发挥重要作用, MAPK 的磷酸化在卵母细胞减数分裂中具有一定的变化规律, GV 期 MAPK 未磷酸化, 在 GVBD 前后开始磷酸化, 且在 M I 期达到高峰。激活 MAPK 的蛋白激酶也是丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶, 分子量在 45~50kDa 之间, 称为 MAPK 激酶 (MAPKK)。而 MAPKK 又被 MAPKKK 通过苏氨酸残基的磷酸化作用激活。MAPKKK、MAPKK、MAPK 一起形成信号转导途径, 传输和放大细胞核和细胞质中的调节信号, 从而控制细胞增殖、分化和发育。不同动物在 MAPK 活性变化与减数分裂恢复间存在时间上的差异, 所以 MAPK 对卵母细胞减数分裂的调节在不同动物间不同, 牛卵母细胞中 MAPK 和 MPF 大约在相同时间被激活, 表明 MAPK 在启动牛卵母细胞成熟中有一潜在作用, 而山羊、猪、鼠卵母细胞中 MAPK 活性出现略迟于 MPF 的激活, 表明 MAPK 可能没有参与卵母细胞成熟的早期事件, 但明显调节 GVBD 后的一系列事件, 如纺锤体形成和 M II 期静止, 所以对于山羊、猪、鼠, 只有先获得减数分裂能力才能磷酸化 MAPK, 然后才能获得成熟分裂的能力。CFS 的一个主要功能成分是原癌基因 c-mos 的产物 mos 蛋白, 其分子量约为 39kDa。mos 含有一个丝氨酸/苏氨酸激酶区域被证明是 MAPK 的上游分子, 并被确定为 MAPKKK 成分之一^[117]。因而, CFS 和 mos 对卵母细胞成熟过程的调节依赖于 MAPK 级联反应以调节减数分裂 GVBD 后的一系列成熟事件, 并通过限制 cyclin B 水解保持 MPF

的高水平活性以维持 MII 静止。在减数分裂中期 mos 能与微管蛋白形成复合体调节减数分裂过程中纺锤体和纺锤极的形成。总之，卵母细胞成熟过程中必须合成一些特殊蛋白质，尤其是细胞周期蛋白和 mos 蛋白以调节减数分裂的进行。其中细胞周期蛋白诱导 MPF 激活，而 mos 蛋白则通过 MAPK 信号级联这一必须媒介在整个减数分裂成熟过程中起作用。mos 蛋白活性也能抑制细胞周期蛋白水解而维持 MPF 的活性。mos 的失活导致减数分裂的完成和卵裂的开始。

3 卵母细胞体外成熟培养的影响因素

3.1 成熟培养液对卵母细胞的影响

卵母细胞的成熟是一个复杂的、动态的过程，胞质和细胞核需要发生一系列连续性的结构和分子方面的变化，才能完成细胞核成熟和胞质的成熟。在体外成熟培养中，通常以第一极体的排出来判断卵母细胞的成熟，但第一极体的排出只是核成熟的标志。而胞质成熟无论从形态上还是从生化上都是难以断定的，且胞质成熟直接涉及卵母细胞的体外受精及早期胚胎发育率，直接关系到能否使供体核实现彻底的再程序化、重构胚能否维持正常的分裂发育^[118,119]。在卵母细胞体外成熟培养过程中，不断研究基础培养基、添加激素种类以及各种生长因子对卵母细胞发育的影响，改进卵母细胞体外成熟的培养体系，以提高体外成熟的卵母细胞支持胚胎发育的能力。

基础培养液是研究者模拟、借鉴卵母细胞在体内生存生长的各种条件，设计出类似体内环境而适宜细胞在体外生存生长的各种培养基^[120]。最初使用的培养液为 Tyrode' s、Earle、Hanks 等盐类缓冲液。近年来转向合成培养液，如目前常用的 TCM199、Ham' sF10 和 Ham' sF12，滨野光市等 (1985) 用含雌激素的 Ham' sF12 作为基础培养基，获 68.8% 的成熟率，但体外受精未获得试管后代^[36]；刘灵等 (1992) 认为 TCM199 和 Ham' sF12 均可用于山羊卵母细胞体外成熟培养，而 TCM199 效果好，用添加 hCG 的 TCM199 培养山羊卵巢卵母细胞，获 55.6% 的成熟率^[41]；徐照学等 (1998) 选用添加丙酮酸钠改良的 TCM199 液作为基础培养基，添加 FSH、LH、和 rbGH 获得 66.7% 的成熟率，并认为 rbGH 与激素协同作用，能显著提高山羊卵泡卵母细胞的成熟率^[33]；TCM 199 添加 10% 血清、促性腺激素和雌激素，卵母细胞的成熟率可达到 90%。用 TCM 199 培养成熟的猪卵母细胞可更好的支持受精卵向囊胚的发育。这些基础培养液中都要添加动物血清，由于血清成分的复杂，存在许多未知因素，对卵母细胞的成熟及后续发育的影响也是复杂多元的，掩盖培养细胞潜在的生理功能^[121]。研究者们正在探索不含血清的成熟培养液。合成培养液 (如 SOFM、KSOM) 中用 BSA 或 PVA 及氨基酸代替血清作成熟培养液，可以使卵母细胞成熟，并能进行受精后的发育。用复合输卵管合成液 (supplemental synthetic oviduct fluid medium,

SOFMaa)培养牛成熟卵母细胞，发育到囊胚的能力与 TCM199 + NCS 培养成熟的卵母细胞相同，氨基酸的添加可以提高成熟卵母细胞的发育能力，增加囊胚中的细胞数量，提高卵母细胞中母源型 mRNA 的转录水平。Gardner 等 (2001) 设计一种基础成熟培养液 (G-Mat)，用重组人白蛋白以及透明质酸代替血清，培养牛卵母细胞，取得理想的效果，不仅囊胚的发育率高于 TCM199 + 10% FCS 培养成熟的卵母细胞，而且囊胚中的细胞数目也显著增加^[122]。合成成熟培养液中能量供应物的选择是其中的一个重要方面，猴卵母细胞成熟液中，葡萄糖是必须的，而且足以满足成熟过程中能量需求，加入丙酮酸后会抑制葡萄糖对胞质成熟及卵丘细胞扩散的促进作用。Sakaguchi 等 (2000) 研究，在无血清的成熟培养液中加入 EGF 和 IGF-I 后，也能加速卵母细胞减数分裂的进程^[123]。无血清培养技术可以排除含血清培养时血清中许多未知因素的干扰，还可能发现一些在有血清培养不容易发现的因子，如细胞生长调节因子、激素等。但其不足之处是成本高，针对性强，一种无血清培养基仅适用于某一类细胞的培养。卵母细胞体外成熟中应用最广泛、效果稳定的基础培养液是 TCM 199。在成熟过程中，TCM199 的基础培养液需添加一定量的血清。血清是卵母细胞成熟和受精必须的物质，它能启动卵母细胞的成熟分裂，即能使卵母细胞核从 GV 期变到 GVBD 期，能为卵丘-卵母细胞提供所需的蛋白质，并与卵母细胞周围的卵丘细胞一起防止透明带变硬，有利于精子的穿入。血清包含各种生长因子、微量元素、激素、维生素和转铁蛋白等，血清有利于细胞的附着，且能中和有毒物质的毒性，使细胞不受伤害^[124]。旭日干等 (1990) 报道，胎牛血清和新生牛血清效果相似，而发情牛血清可更有效地提高体外受精胚的发育率^[34]。张涌等 (1996) 认为发情山羊血清 (EGS) 有利于山羊卵母细胞的成熟^[40]。而 Ocana 等 (1994) 报道，EGS 对羊卵母细胞的成熟与 FCS 无显著差异，含 BSA 成熟液的卵母细胞成熟率低于血清组，但是可以防止透明带硬化和利于精子入卵^[125]。实验表明，培养条件与受精率和囊胚发生率有较强的相关性。所以，哺乳动物卵母细胞成熟培养液的改进主要是在培养液中加入卵泡液、细胞成分、激素和血清等。卵泡液作为卵母细胞发育的微环境能促进卵母细胞的体外成熟，增强精子穿入卵母细胞的能力并刺激和调节雄原核的形成。研究表明，卵泡内细胞，特别是颗粒细胞、卵丘细胞对牛、羊卵母细胞的细胞核成熟和细胞质成熟是非常重要的。在培养液中加入激素，如 FSH、hCG、LH 等对卵母细胞体外成熟有促进作用。徐照学等 (1998) 在 TCM199 中加入 15 $\mu\text{g/L}$ 重组牛生长激素 (rbGH)，卵母细胞成熟率达 67.9%，明显高于不含 rbGH 培养组 (51.3%)^[33]。添加血清能改变细胞功能，使颗粒细胞和膜细胞对卵母细胞减数分裂恢复的抑制失去效果，同时也能为卵母细胞成熟提供所需蛋白质。胎牛血清中含有卵母细胞成熟所需要的激素和生长因子。培养液中加入发情牛血清 (ECS) 比胎牛血清 (FCS) 和其他激素更能提高成熟卵母细胞的受精率和卵裂率，添加浓度以 10% 为宜。

3.2 激素对卵母细胞体外成熟培养的影响

激素是哺乳动物卵母细胞核成熟的基本调节物。卵母细胞成熟培养液中必须添加激素，特别是促性腺激素对成熟的启动发挥重要作用。牛卵母细胞体外成熟添加促性腺激素可以显著提高卵母细胞的成熟率。研究卵母细胞成熟与激素变化的规律，FSH、LH 和 E_2 是常用激素，PMSG 也能使卵母细胞体外成熟。FSH 和 LH 是成熟培养液中使用较多的促性腺激素。FSH 诱导卵丘细胞扩展是卵母细胞成熟的前提条件，刺激卵丘细胞产生一种促卵母细胞成熟因子。FSH 还促进颗粒细胞分泌雌激素，而雌激素又直接作用于卵母细胞（有雌激素受体），调节卵母细胞成熟，钙离子储存，进而影响到体外受精的效率。在排卵过程中，卵母细胞第一次减数分裂的重新启动到成熟排出第一极体，由 LH 峰激发的。LH 受体存在于卵泡膜细胞和卵丘细胞上，卵母细胞从卵泡转移到培养液中自发成熟，说明卵泡液中存在卵母细胞成熟抑制因子，LH 峰出现克服了其抑制作用^[65]。但对 LH 的作用，不同的研究有不同的结论，牛小于 8mm 的卵泡中，颗粒细胞只有 FSH 受体 mRNA，而没有 LH 受体 mRNA^[126]。在不含血清的成熟培养液中，只有 FSH 能影响卵母细胞的成熟，而 LH 没有作用。此外，HMG 是一种用于人临床的促性腺激素，含有 1:1 的 FSH 和 LH，也能用于成熟培养。陈俊颖等 (2002) 比较了 FSH 和 LH 配合使用与 HMG 单独使用的效果，成熟结果无显著差异，但 HMG 使用方便且结果稳定^[127]。在体内，FSH 能促进优势卵泡的颗粒细胞产生 LH 受体；在 LH 峰的作用下，卵母细胞减数分裂恢复并导致排卵。在体外，FSH 和 LH 共同起着十分重要的作用^[128]。但也有人认为，促性腺激素抑制卵母细胞的成熟，FSH 不仅抑制胞质和细胞核的成熟，而且对减数分裂纺锤体有损害，LH 和 hCG 尤其是 hCG 使极体排出率和自发激活率增加^[129, 130]。但促性腺激素的这些副作用可以通过添加血清来抵消。添加血清有利于胞核成熟，即极体排出率高且形态正常。FSH 通过升高颗粒细胞内 cAMP 水平使卵母细胞成熟受到抑制，同时 FSH 还可使卵丘细胞扩散^[131]，使经卵丘细胞运输到卵母细胞并抑制卵母细胞成熟的物质如 cAMP 减少，导致卵母细胞成熟。

各种动物卵母细胞成熟培养液中通常要添加雌二醇 (17β -estradiol, E_2)，在人卵母细胞成熟液加入 E_2 有利于胞质成熟，人卵母细胞成熟率和受精能力就通过测定卵泡液中 E_2 含量来鉴定，因为 E_2 促进人卵母细胞成熟。Margot 等 (2002) 报道猪 COCs 自身能分泌类固醇，因此，猪卵母细胞成熟液中没必要添加雌激素^[132]。然而在其它动物的研究中更多得到相反的结论，如在有 FSH 存在的情况下， E_2 的添加并不能促进牛卵母细胞的核成熟及胞质成熟。相反，雌激素的添加可能会导致形成异常纺锤体比率的增加。 E_2 对小鼠、大鼠、猪卵母细胞成熟有抑制作用，而能促进牛、兔卵母细胞的胞质成熟。但 Beker 等 (2002) 得出 E_2 能显著的影响牛裸卵母细胞到达 MII 期并建议在牛卵母细胞成熟液不添加 E_2 ^[133]。刘灵等 (1992) 认为 E_2 能极显著提高山羊卵母细胞成熟率^[41]。 E_2 可增强 FSH 对颗粒细胞有

丝分裂和卵泡液的形成，一定浓度的 E₂ 促进颗粒细胞蛋白质的合成，并进而影响卵母细胞的成熟。然而高浓度的 E₂ 可抑制颗粒细胞内芳香化酶的活性，并进而抑制 E₂ 生成途径的多种酶活性，颗粒细胞不能正常行使合成功能，使卵母细胞成熟受抑制。在体内高浓度的 E₂ 可导致卵泡囊肿，正常情况下短暂的 E₂ 下降后才出现 LH 峰。在绵羊，E₂ 能抑制完整卵泡类固醇的合成，降低卵母细胞成熟后受精能力和发育能力。孕酮 (progesterone, P) 对牛、猪、和人卵母细胞成熟有正效应，对绵羊则相反。Mingoti 等 (2002) 报道，牛 COCs 能分泌 E₂ 和 P，兔、大鼠、和人 COCs 也分泌 P 和 E₂^[134]。FSH 和 EGF (表皮生长因子, epidermal growth factor, EGF) 激发卵母细胞减数分裂，经第二信使 cAMP 和 IP₃，使 Ca²⁺ 进入卵母细胞，EGF 比 FSH 更能显著促进小鼠颗粒细胞的扩展。猪卵母细胞成熟培养的时间较长，一般都要 48h，在培养的前 24h 添加 eCG、hCG 和 E₂，然后去除所有激素再培养 24h，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。在促性腺激素 FSH/LH 存在的条件下，加入 P 成熟培养牛卵母细胞，可获得与添加血清相同的成熟率和卵裂率，E₂ 没有这种作用。

3.3 生长激素和生长因子的作用

生长激素 (growth hormone, GH) 能加快牛、大鼠、猪卵母细胞体外成熟的速度^[135]，对于牛还显示增加胚胎卵裂率和囊胚发育率的效果。体外成熟培养中，GH 能促进卵母细胞细胞核的成熟，诱导卵丘细胞扩散，并显著提高精子的受精率，促进卵裂及胚泡的形成。卵丘细胞及卵母细胞上均有 GH 受体，GH 与之结合后，通过信号传导对卵母细胞成熟发挥作用。与 GH 作用相反，生长激素释放激素 (GHRH) 及其结构类似物内肠肽 (vasoactive intestinal peptide, VIP) 并不会促进牛卵母细胞的核成熟，而且对胞质成熟有负效应。体外成熟液添加 GH 可提高卵母细胞成熟效率。EGF 能够诱导猪^[136]、牛^[137]体外培养卵子的卵丘扩散，并促进核成熟。这种作用是由卵丘细胞介导的，因为培养裸卵时，添加 EGF 没有效果。EGF 能促进卵母细胞成熟过程中蛋白质的合成，提高卵母细胞质的成熟质量，添加 EGF 培养成熟的卵母细胞受精后的发育能力更强。转移生长因子 (transforming growth factor, TGF α) 在结构和功能上与 EGF 相似，可以和 EGF 受体结合，同样能诱导猪、牛卵丘细胞扩散，促进卵母细胞核成熟。胰岛素样生长因子 (insulin like growth factor I, IGF-I) 对猪、牛卵母细胞的体外成熟也有促进作用，不仅能促进卵丘细胞的扩散和核成熟，而且能增加所得胚胎的发育能力^[138]。在含激素和血清的成熟培养液中加入 IGF-I 培养马卵母细胞，对核成熟的影响不明显，但卵母细胞皮质颗粒在成熟过程中迁移程度加强，卵母细胞的孤雌发育能力也显著增强，表明 IGF-I 促进卵母细胞的胞质成熟。胰岛素在高浓度时可以结合 IGF-I 的受体，也能增加猪体外成熟卵母细胞的受精率和卵裂率，诱导牛卵丘细胞的扩散、增加囊胚中的细胞数。周欢敏等 (2001) 认为山羊卵泡卵母细胞在 FSH 存在情况下，IGF-I

和 EGF 及碱性成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, bFGF) 这三种生长因子单独或有选择地联合使用, 对山羊卵泡卵母细胞的体外存活能力均具有正向调节作用^[39]。神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 是卵母细胞成熟过程的调节物质之一, 它既可作为一种自分泌 / 旁分泌的因子参与卵母细胞功能的调节, 并能中介 LH 信号。NGF 对卵母细胞核、质成熟的促进作用目前还未被证实, 可以肯定它能影响猪卵母细胞成熟的动力学, 加快进入 MII 期的速度。TGFb、激动素 (activin) 等因子对卵母细胞成熟的影响不大。有研究显示, EGF 对卵母细胞成熟的促进作用需要促性腺激素的协同。但也有相反的报道认为, 在有 EGF 或 FCS 的培养液中, 加入 FSH 并未显示出明显的效果。

3.4 卵泡液和颗粒细胞对卵母细胞体外成熟培养的影响

卵泡液 (follicular fluid, FF) 是卵母细胞体内发育的介质, 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。卵泡液所含的因子在体内随机体内分泌状态的变化而变化, 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作用。张明觉等 (1955) 发现兔子的卵泡液可以抑制成熟分裂, 随后发现在地鼠、大鼠、小鼠和猪等动物上也有此现象^[139]。目前从猪和大鼠分离出抑制成熟物质 (OMI), 它来自于颗粒细胞^[4]。卵泡液的促进作用主要表现在提高卵母细胞质成熟的质量, 增加胚胎的发育能力; 控制卵泡液在培养液中的添加浓度, 可以消除其对核成熟的抑制作用。卵泡液对核成熟的抑制作用与所采卵泡的大小有关, 来自小卵泡 (<3 mm) 和中卵泡 (3- 8 mm) 的卵泡液抑制卵母细胞核成熟, 大卵泡液 (> 8 mm) 对核成熟没有抑制作用^[140]。猪卵泡液有改善颗粒细胞扩展的物质, 经分离鉴定是一种 6.5kDa 耐高温蛋白, 促进卵母细胞核成熟和雄原核的形成, 并能完成受精和随后的发育。Huang 等 (2001) 报道 20%、40%、100% 猪卵泡液对猪卵母细胞成熟率和卵裂率影响差异不显著, 但受精液中含 40% 和 100% 卵泡液, 卵裂率高于对照组^[141]。Hinrichs 等 (2002) 报道, 马卵母细胞在 100% 卵泡液中成熟, 受精率显著高于无卵泡液和 20% 卵泡液成熟组^[142]。Raghu 等 (2002) 报道水牛卵泡越大, 卵母细胞发育率和受精率越高, 胚胎发育潜力也越大^[143]。LH 峰后 20h 牛卵泡液对牛卵母细胞的成熟率和核发育率, 要比 0h 和 8h 显著高。邵华等 (2002) 报道绵羊卵泡液对山羊卵母细胞减数分裂产生抑制作用, 而山羊卵泡液不能抑制卵母细胞减数分裂的恢复。卵泡液的抑制效果随着卵泡的不同发育阶段而改变, 卵泡的成熟程度愈高, 所产生的抑制效果愈弱。卵泡液对牛卵母细胞核成熟的抑制也是无效的^[2]。

大多数哺乳动物, 生长的卵母细胞被颗粒细胞包裹。颗粒细胞不仅为卵母细胞提供营养物质, 还能产生信号刺激某些结构蛋白的合成和一些特异蛋白的成熟。颗粒细胞产生的 EGF、IGF-I 等对胞质成熟很重要, 能促进颗粒细胞的代谢。抑制素和激活素等其它自分泌和旁分泌因子也与胞质成熟有关, 二者结合使用, 能促进核成熟和受精。其浓度随卵泡

的增大而增高，而这些激素是由颗粒细胞分泌的。卵母细胞体外成熟培养时，同时加入促性腺激素和颗粒细胞可提高减数分裂率，促性腺激素促进核成熟是由颗粒细胞介导的，颗粒细胞通过卵丘细胞的作用提高卵母细胞中 MPF 的水平，促使其发生减数分裂^[144]。促性腺激素和颗粒细胞除对卵母细胞的核成熟有协同作用外，二者各自对胞质的成熟也有一定的作用。如促性腺激素可促进人、猴卵母细胞的激活，并可使其顺利通过 8-细胞阶段^[145]。在无促性腺激素的体外培养系统中加入颗粒细胞对卵母细胞卵裂前期的发育有促进作用，用该方法已经将来自未经激素处理的猴卵母细胞经体外成熟培养后发育到囊胚。无论是促性腺激素还是颗粒细胞对直径不足 1.0 mm 的卵泡中的卵母细胞无明显作用，因为发育早期卵泡中的颗粒细胞上缺乏促性腺激素受体。虽然一定程度上将卵母细胞与促性腺激素、颗粒细胞共培养使其周围环境接近体内成熟时卵泡液的内环境，但体外成熟后卵母细胞的减数分裂和发育能力仍不如体内成熟的卵母细胞。这是由于卵丘细胞对卵母细胞的特殊作用在体外成熟时随颗粒细胞扩散而丧失。排卵前颗粒细胞扩展，合成大量胞外基质，富含透明质酸 (HA)，有利于排卵后进入输卵管，也保证卵母细胞正常的受精和胚胎发育潜力。当只剩颗粒细胞和透明带时，FSH 并不能使颗粒细胞扩展和透明质酸增加，说明卵母细胞可能分泌促卵丘扩展因子。当卵丘-卵母细胞复合体成熟扩张不充分时，可能与卵母细胞自身的活性有关。卵母细胞存在时，FSH 才促进颗粒细胞扩展，说明颗粒细胞和卵母细胞是相互作用的。

3.5 卵泡大小和卵丘细胞对卵母细胞体外成熟的影响

卵泡及卵母细胞直径与卵母细胞的减数分裂恢复和发育能力有关，即卵母细胞的质量和受精后的发育潜力与卵泡大小、包裹程度以及细胞质形态等因素有关。在体内，卵母细胞在最后成熟阶段，卵泡直径由 1mm 增加到 15~20 mm。Barnes 等 (1991) 研究，卵泡直径达到 3mm 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、蛋白质和其它因子以保障受精后胚胎的正常发育^[146]。在体外，来源于不同直径卵泡的卵母细胞在体外成熟和受精后，囊胚发育率存在明显差异。

大卵泡 (直径 > 6 mm) 卵母细胞的卵裂率及囊胚发育率显著高于小卵泡 (直径 < 6 mm)。Barnes 等研究，从小卵泡吸取不成熟卵母细胞形成的胚胎发育速度较慢，与从大卵泡获取的卵母细胞相比，不能卵裂的比例较高。Hendriksen 等 (2000) 研究，小于 2 mm 牛卵泡卵母细胞体外囊胚发育率最低，3~7 mm 之间卵泡卵母细胞有相似的卵裂率及囊胚发育率，而来自 8 mm 卵泡卵母细胞体外囊胚发育率最高^[147]。Tsatriri 等 (1993) 研究，猪卵泡直径为 6~12 mm，第一极体排出率为 80.1%，直径为 3~5 mm 为 54.8%，直径为 1~2 mm 时仅为 15.6%^[148]。Motlik 等 (1984) 指出，直径为 0.4~0.8 mm 猪卵泡卵母细胞体外培养后很少核成熟^[61]。虽然上述结果不尽一致，但有一点是统一的，即大卵泡 (> 2 mm) 卵的体外受精效果优于小卵泡 (< 2 mm) 卵。小卵泡卵母细胞由于卵泡内的卵丘细胞、内膜细胞等

体细胞尚未分化至具有激素或生长因子受体阶段，且细胞质的不完全成熟以及由于 mRNA 合成的缺乏而造成某些必需的蛋白质合成的减少是导致小卵泡卵母细胞发育潜力降低的主要原因。Hyttel 等 (1997) 指出，RNA 的早期合成和积累是卵母细胞成熟分裂和早期胚胎发育的物质基础。根据卵泡大小可确定 FSH 的刺激效果，卵泡大，FSH 刺激效果明显，而在小的卵泡群，其刺激效果差^[149]。Xu 等 (1995) 发现牛小腔卵泡中的颗粒细胞没有 LH 受体 mRNA，即小腔卵泡的卵母细胞不对 LH 产生应答，早期卵泡卵母细胞 RNA 合成非常活跃^[150]。Smedt (1994) 报道 2 mm 山羊卵泡卵母细胞 RNA 合成非常活跃，当直径增加到 3mm 时，RNA 转录水平下降^[29]。卵母细胞的成熟与卵丘细胞的作用分不开。COCs 的初期质量决定卵母细胞的成熟能力。Hashimoto 等 (1998) 发现，对有完整缝隙连接的卵母细胞，卵丘细胞的密度为 $1.6\sim 3.2\times 10^6$ ，体外成熟后的发育能力最强^[151]。Byskov 等 (1997) 认为卵丘细胞能分泌减数分裂激活物 (meiosis-activating substance, MAS)，MAS 能诱发卵母细胞细胞核由休止期进入成熟分裂期，促进细胞质成熟。卵丘细胞合成和分泌 MAS 需要来自卵母细胞的信号，这一信号的传递是通过卵丘细胞和卵母细胞的间隙连接完成的^[152]。卵母细胞能有效吸收卵泡液中的低分子物质，经代谢转化，通过细胞连接，为卵母细胞的生长提供物质和能量。而卵母细胞在生长过程中释放促进卵丘细胞生长的因子^[153]。二者相互促进，使卵母细胞最后成熟。超微结构研究，从卵巢中割出的卵母细胞微绒毛较少且大都呈短粗倒伏状，甚至没有，而从有腔卵泡中穿刺获得的卵母细胞表面有较多的微绒毛且细长直立^[154]。卵母细胞成熟过程中，通过微绒毛与卵丘细胞的物质交换十分重要。所以，那些表面没有微绒毛的未成熟卵母细胞可能得不到激素的作用或作用较少，所以成熟率低。

孙青原等 (2000) 研究，壁层颗粒细胞与卵丘细胞之间，卵丘细胞与卵丘细胞之间，以及卵丘细胞与卵母细胞之间通过间隙连接产生异源性代谢偶联和电偶联。卵母细胞的生长发育依赖于从这些细胞及周围卵泡液获得的信息。间隙连接介导了卵母细胞和卵丘细胞之间的通讯联系。无论是颗粒细胞之间同质的间隙连接，还是颗粒细胞与卵母细胞间异质的间隙连接，在整个卵泡生长阶段，从原始卵泡的激活到卵母细胞恢复减数分裂之前始终维持，卵母细胞减数分裂恢复后不久，细胞间的间隙连接丢失，一些大分子的代谢产物和信息分子再也不能在体细胞和配子细胞中穿梭交流。在体内，排卵前促性腺激素峰诱导卵母细胞恢复减数分裂的过程中总伴随着卵丘扩展^[155]。排卵时扩展了的 COC 作为一个整体从卵泡中释放出来。卵丘扩展是卵母细胞成熟的必要条件，但卵母细胞成熟并不需要卵丘细胞完全扩展，因为 FSH 作用于 COC 使其卵丘细胞产生一种促卵母细胞成熟因子，而这种促成熟因子的产生必须依赖于卵丘发生一定程度的扩展，但并不一定需要卵丘完全扩展。Park 和 Fukui^[156]认为：卵丘细胞能诱发精子发生顶体反应，并增加其穿透能力，但卵丘细胞必须保持与卵母细胞的紧密结合。一定数量卵丘细胞的存在，是卵母细胞完成体外成熟及受精的必要条件。但 Hawk (1993) 的实验证明：卵丘细胞过多过致密也会阻碍精子入卵。

他把卵母细胞分成带有十分完整的卵丘细胞和带有部分卵丘细胞两类，前者的受精率仅为27%，人为地去掉大部分卵丘细胞后可使受精率加倍（56%），但仍不及原本就带有部分卵丘细胞的卵子的受精率（61%）^[157]。

3.6 其他添加物对卵母细胞体外成熟培养的影响

巯基类物质半胱氨酸、谷胱甘肽、谷氨酰胺、 β -巯基乙醇等可以清除卵母细胞内氧自由基，同时还可以在细胞分裂时作为二硫键断裂的供氢体^[158~160]。所以对卵母细胞的胞质成熟有明显的促进作用。卵母细胞培养过程中胞内产生的反应氧系（reactive oxygen species, ROS）对卵母细胞的发育能力有影响，ROS 在细胞内的水平由超氧化物歧化酶（SOD）、谷胱甘肽（GSH）等物质的中介代谢过程控制。小鼠、仓鼠、猪、牛等动物卵母细胞在成熟过程中都要合成谷胱甘肽。谷氨酰胺（glutamine, Gln）有利于那些终止或降低有害氧化反应的代谢途径的实现，保护细胞免受 ROS 侵害，提高成熟卵母细胞质量。在牛卵母细胞体外成熟培养液中分别加入 SOD、GSH、Gln，均有利于卵母细胞的发育能力，特别是 GSH 和 Gln 添加后，卵母细胞受精后的卵裂率和囊胚发育率均显著增加^[161]；成熟液中加入 GSH 增加山羊卵母细胞内 GSH 的浓度，但没有明显提高卵母细胞的受精率。体细胞和卵母细胞都不能直接将 GSH 转移进胞内，细胞内的 GSH 是由其他物质合成的。参与合成 GSH 的物质包括甘氨酸（glycine）、谷氨酸（glutamate）和半胱氨酸（cysteine）。牛卵母细胞成熟液中添加半胱胺（cysteamine）、 β -巯基乙醇（ β -mercaptoethanol）、半胱氨酸及胱氨酸（cystine），都可诱导卵母细胞内 GSH 合成，但在山羊卵母细胞成熟液中分别添加上述四种物质后，只有添加半胱胺和 β -巯基乙醇培养成熟的卵母细胞的正常受精率显著提高，而半胱氨酸及胱氨酸则没有影响。水牛卵母细胞成熟液中添加 50 μ M 半胱胺虽然对成熟率和体外受精胚的卵裂率没有明显的促进作用，但能显著增加胚胎发育到桑椹胚和囊胚的比率^[162]。培养液加入葡萄糖提高牛卵母细胞核成熟率，增加胞内 GSH 合成，有利于后续发育，但葡萄糖浓度过高（20 mM）则表现相反的效应^[163]。

Twin-80 是一种非离子型表面活性剂，成熟培养液中添加能够降低液体的表面紧张度，它自身并不能促进卵母细胞成熟，但与 EGF 配合使用时，能显著提高卵母细胞成熟率^[164]。副甲状腺素相关蛋白（PTHrP）是存在于卵母细胞和胞外基质中的一种多肽，无血清培养液中加入 PTHrP 能增加受精卵向囊胚的发育能力。MAS 是一种固醇类物质，小鼠的卵丘细胞受到 FSH 处理后，能分泌 MAS。MAS 能够启动小鼠生殖细胞的减数分裂。体外条件下，MAS 可以诱导受 IBMX 阻滞的小鼠、大鼠、牛卵母细胞减数分裂的恢复。体外培养时添加 MAS 能够提高人、小鼠卵母细胞成熟速率和质量，有利于胚胎发育。MAS 提高卵母细胞成熟质量与它能够支持胞内微管的组装、延迟皮质颗粒的释放有关，后者被认为可以降低卵母细胞的受精率。一氧化氮（NO）在卵母细胞成熟中的作用近年来受到关注。小鼠卵母

细胞成熟液中加入低剂量的 NO 生成物硝普钠 (sodiumnitroprusside, SNP)能显著地提高卵母细胞的成熟率, NO 合成的抑制剂同时也抑制卵母细胞减数分裂的恢复, 这种作用对剂量非常敏感, SNP 在 10⁻⁵M 或 10⁻³M 时, 表现细胞毒性作用^[165]。

3.7 延迟成熟培养

卵母细胞成熟能力的获得并不意味着具有完成成熟分裂的能力, 也不意味着具有受精能力和完全的胚胎发育能力^[13]。体外成熟培养的卵母细胞经体外受精后囊胚发育率远低于体内成熟的卵母细胞, 这是由于体外成熟卵母细胞的不充分获能造成的。卵母细胞在体外培养延长生发泡期 (GV), 可促进卵母细胞进一步获能, 从而提高发育潜能。卵母细胞真正意义上的成熟应包括核成熟、胞质成熟和卵质膜的成熟。在体外成熟培养中, 先用蛋白质合成抑制剂放线菌酮 (CHX) 维持成熟阻滞 6h, 同时加入 dbcAMP, 调整降低胞内 cAMP 水平, 然后再进行成熟培养, 可显著提高成熟卵母细胞发育能力^[166]。单纯用 CHX 预先处理 6h 对卵母细胞的发育能力起抑制作用, 但若同时加入小卵泡 (3~5 mm) 中的颗粒细胞以及 LH, 成熟的卵母细胞发育能力显著增强。地塞米松 (dexamethasone, DEX)、睾酮+dbcAMP 预处理卵丘-卵母细胞复合体 (COC), 也能达到对猪卵母细胞的可逆性阻滞, 成熟率不受影响, 但降低了卵母细胞的发育能力。另据报道, 卵丘卵母细胞复合体成熟培养前置 4℃预处理 4h, 提高卵母细胞的发育能力, 可能与降低卵丘细胞凋亡有关。小于 5 mm 的卵泡经 4℃处理, 卵丘细胞中没有 Bax 及 Bcl-xs 等与细胞凋亡有关因子 mRNA 的存在, 相反, 在 37℃孵育的 COC, 这些凋亡相关基因都有表达^[167]。邵华等 (2002) 用“两步法”培养山羊卵母细胞, 把山羊卵母细胞先与半卵泡共培养 24h 后, 再成熟培养 24h 来延迟成熟培养时间, 获得较高的成熟率 (64.29%)^[2]。

3.8 其它条件对卵母细胞成熟的影响

卵母细胞成熟潜力与卵巢运输条件、采卵季节和取卵方法等有很大关系。随着哺乳动物胚胎操作技术的深入研究, 从屠宰厂废弃卵巢中获取卵母细胞, 已成为体外受精、核移植、转基因等相关胚胎技术的主要材料来源。卵母细胞采集是进行体外成熟的前提。屠宰卵巢卵母细胞的机械采卵有三种方法即抽吸法、切割法和剖割法。切割法是切割整个卵巢, 虽然采集到的卵母细胞较多, 但可用于体外培养的较少, 因为这样切到的卵母细胞大小相差很大^[168, 169]。抽吸法采集到的卵母细胞数与 Pawshe 等 (1994) 报道的基本相同^[28]。而剖割法采集到的卵母细胞数最多, 剖割法采集到的裸卵数显著低于切割法^[170]。所以, 剖割法更适合于山羊卵巢卵母细胞的采集。一般观点认为繁殖季节采卵数要优于非繁殖季节^[171]。郭继彤、陈俊颖等先后得出非繁殖季节的山羊卵巢可获得更多可用的卵母细胞。山羊在非繁殖季节也有大量卵泡发生, 处于非繁殖季节山羊卵巢有类似于繁殖季节的卵泡动力学变化^[172]。非繁殖季节山羊卵泡内卵母细胞仍有发育能力, 通过短日照以诱发山羊非繁殖季节

发情和排卵^[173]。这些卵泡的大小比繁殖季节的卵泡均等且少有或没有黄体，与繁殖季节相比，非繁殖季节的卵泡总数要高一些，所以平均每个卵巢采集到的卵母细胞数比繁殖季节多^[174]。而繁殖季节屠宰的山羊大多处于妊娠期，卵巢表面多有大的黄体。卵巢黄体会影响到卵母细胞的成熟数量，但对成熟后受精和卵裂率无影响。张涌等 (1996) 比较繁殖季节和非繁殖季节山羊卵巢大腔和小腔卵泡卵母细胞体外成熟情况表明，繁殖季节的成熟率均高于非繁殖季节的成熟率，并将体外成熟的小腔卵泡卵母细胞与体外获能精子进行受精，受精率为 35.7%^[40]。

卵巢运输时，温度、时间和保存方法对卵母细胞的利用率也有很大影响。运输时间越短越好，最大阈值 6h。卵母细胞成熟培养条件要求很严格，尽量模仿本物种体内卵母细胞成熟环境，培养温度应和体温一致。张涌等 (1996) 在 38.5℃ 培养山羊卵母细胞最高获得 68.4% 成熟率^[40]；刘灵等 (1992) 在 39℃ 培养山羊卵母细胞获 79.4% 的体外成熟率^[41]；徐照学等 (1998) 在 38.5℃ 和 39℃ 下培养山羊卵母细胞 24h，其成熟率无显著差异^[33]。山羊卵母细胞一般成熟在 5% CO₂、饱和湿度、38.5~39℃ 培养。Rho 等 (2001) 研究表明，山羊卵母细胞成熟率 27h 要显著高于 24h 组^[175]。猪 48h、马 24~42h。在实验室采卵过程中，温度很重要。室温下，对山羊裹着的卵母细胞进行操作，在减数分裂期间引起畸形。尽管在室温下回收的卵母细胞，同在 30~35℃ 下分离的卵母细胞相比，以同样的比例可以发育到 MII 期，但其中有些 (11.5%) 出现不正常减数分裂的纺锤体，影响中期板的形成，造成异常的染色体分布。裹着卵泡的绵羊卵母细胞，室温下操作 5h，并不引起畸形。然而，在核泡破裂期间，温度降低，引起纺锤体构造的解体^[31]。所以实验室采卵时，要无菌操作，快捷、高效，操作台要恒温，保持 30~35℃，1h 内完成采集为好。另外，郭继彤认为卵巢运输时贮存温度应在 30℃ 以下，而张涌等建议 35~38℃ 更好些。

总之，卵巢卵母细胞生长、发育是一个极其复杂的过程，涉及到多种体细胞和生殖细胞自身。在众多培养体系中，卵母细胞总是被阻滞于减数分裂，发育到一定阶段后获得恢复减数分裂能力，并最后发育成熟。卵母细胞减数分裂能力的重新获得和生长发育是密切相关的。充分利用能够维持不同发育阶段卵母细胞在体外生长发育的培养体系，阐明参与卵母细胞生长过程以及卵泡细胞间信号通讯的分子机制，建立和完善更有益于卵母细胞体外发育的培养体系，认识山羊卵泡卵母细胞体外发育过程和规律，从而为体外生产大量具有发育能力的卵母细胞奠定基础。

第二节 哺乳动物体外受精和早期胚胎体外培养的研究进展

哺乳动物体外受精研究已有 100 多年历史。早在 1878 年，澳大利亚科学家 Schek 就用兔进行过试验，此后 Onaoff、Pincus 等科学家曾对家兔和小鼠进行过体外受精。直到 1957 年，张民觉和 Austin 才在试验中发现试管小兔。随着体外受精方法的不断完善，已先后在

30多种哺乳动物体外受精并相继获得成功，其中移植获得试管后代家畜有牛、山羊、猪、绵羊等。关于人试管婴儿也有诸多报道，Stephoe和Edwards(1978)报道了世界上首例试管婴儿，至今已有数十万例试管婴儿在世界上诞生。体外受精(in vitro fertilization, IVF)是指哺乳动物的精子和卵子在体外人工控制的环境中完成受精过程的技术。哺乳动物体外受精技术从50年代初到现在已得到深入而系统的发展，但对山羊体外受精的研究则开始得较晚。日本学者Hanada(1985)用超排山羊卵母细胞与精子体外受精培育出世界上第一只试管山羊^[176]。我国学者钱菊芬(1991)以相同的方法培育出我国第一只试管山羊^[177]。Younis(1991)首次进行了由体外成熟山羊卵母细胞经体外受精而使受体羊怀孕的实验^[178]。刘灵等(1992)年培育出世界上第一只由卵巢卵母细胞经体外成熟和体外受精而得到的试管山羊^[41]。哺乳动物体外受精主要包括：卵母细胞体外成熟；精子获能；精卵结合即受精，胚胎早期培养和胚胎移植等步骤。

1 精子获能

1.1 精子获能的概念及特点

1951年张明觉^[179]和Austin^[180]分别发现精子在生殖道内成熟一段时间,才能获得受精能力。1952年被Austin命名为“精子获能”。精子成熟后,虽然具有一定活力,但却没有受精能力。精子在通过雌性生殖道过程中,经历一系列生理、生化变化,获得受精能力,这个过程为精子获能(sperm capacitation)。精子获能是所有哺乳动物精子受精前必须经历的一个生理阶段。精子在体内获能,主要发生在子宫中,在输卵管中获能更为充分,而且精子获能没有种属特异性,即羊精子可以在兔生殖道内获能。获能过程不同物种有共同特点,如精子代谢要发生很大变化,精子活力增强,呼吸率升高,耗氧量增加,使精子产生超激活运动(hyperactivated motility, HAM)或鞭打运动(whiplash motility),即精子头部侧摆幅度和频率明显增加,尾部振幅加大,频率加快,是精子受精前为适应受精需要而发生的一类特殊运动类型。获能所需要的时间因动物种类而有所不同。一般1.5~16h。即使在同一种类内也存在着明显的差异。如小鼠附睾液中精子在适当溶液中稀释30 min即可获能,猪精子需2~3h获能。精子获能具非均一性,即有先有后,所以常用群体百分率表示精子获能程度。获能也是一个可逆的过程,即获能精子一旦与精浆和附睾液接触,又可去获能。表明精浆和附睾液中存在去能因子(decapaciation factor, DF)^[181, 182]。DF是一种糖蛋白大分子,分子量在48~200 kDa。精胺是精浆中一种获能抑制因子,它可抑制仓鼠、豚鼠及人精子体外获能、顶体反应(acrosome reaction, AR)和受精能力。

精子获能期间没有明显形态学变化,但生化变化涉及到包裹在精子表面的附睾蛋白和精浆蛋白的除去或重新分布。凝集素结合能力丧失、表面电荷、SH和NH₂基团减少,而

且膜脂类成分发生改变、膜蛋白迁移和顶体暴露等。获能是一个低 Ca^{2+} 浓度依赖过程。在获能期间，精子膜离子通道，特别是钙通道被激活^[183]、耗氧量和糖酵解明显增加，腺苷酸环化酶和神经氨酸苷酶被激活，导致胞内 cAMP 含量升高和精子活力增加，从而促进精子获能。顶体酶原转化为有活性的顶体酶，蛋白酪氨酸磷酸化加剧^[184]，从而引起顶体反应。有助于精子与卵子识别、结合和穿透。精子获能是精子顶体反应的前奏，只有获能的精子才能发生顶体反应，所以顶体反应标志着精子获能的完成。

1.2 精子获能后的变化

精子获能后，在接触透明带过程中，头部（顶体）发生了明显形态学变化，最终将顶体帽外的质膜和顶体外膜融合，穿孔，释放出水解酶类。这一变化过程称为顶体反应。顶体反应是精子质膜与顶体外膜融合和小泡化，从而使顶体基质中各种酶释放出来，如透明质酸酶分解卵丘细胞间质，顶体酶(胰样蛋白酶)，还有磷酸酯酶，放射冠酶等酶类，降解卵母细胞外颗粒细胞基质，水解透明带，并使精子质膜与卵质膜融合，使卵母细胞顺利受精。不同物种囊泡化方式不同。如牛精子是质膜与顶体外膜融合囊泡化；而猪、绵羊等是质膜膨胀破裂和顶体外膜内陷囊泡化。人的卵泡液、卵丘卵母细胞复合体（COC）、透明带均可刺激精子发生顶体反应，这是由于卵泡液中含有孕酮与大分子物质如白蛋白、氨基葡萄糖等。顶体反应前，有些动物的精子开始猛烈移动，称为超激活运动，尾部呈有力的鞭打状，为“8”字形。精子激活部位是在输卵管，特别是壶腹部。

1.3 影响精子获能的因素

1.3.1 环境因素

精子获能时，离子变化起主导作用。获能前，膜内 K^+ 高， Na^+ 低；而顶体反应后，这种离子平衡打破，产生了 Ca^{2+} 的短暂内流。膜电位变化，引起精子 Ca^{2+} 浓度升高，从而引发顶体反应。

温度对精子获能很重要，如猪、羊精子获能温度 $38.7\sim 39.7^\circ\text{C}$ ，比正常体温下更有效。轻微的温度变化，可以使质膜脂类的物理学状态产生很大变化。超激活运动发生的同时伴随着由细胞内 H^+ 流出而导致的细胞内 pH 升高^[185]。获能最适 pH 为 $7.4\sim 8.0$ ，低于 6.7 延长获能时间，高于 8.2 ，缩短获能时间，但不利于精子存活。渗透压对精子获能也很重要，适宜渗透压为 $295\sim 310\text{ mosm/kg}$ ^[186]。高离子强度和高渗透压有利于精子获能，如 Oligant 和 Brackett (1975) 使用高离子强度液获得试管兔，随后以 380 mosm/kg 的高渗透压液也获得试管兔^[187]。钱菊芬等 (1991) 用高离子强度液处理山羊精子，与输卵管卵母细胞体外受精获得我国首例试管山羊^[177]。

1.3.2 获能液和获能方法

精子同精浆接触，获能时间就会延长。因为精浆内含有去获能因子、纤粘连蛋白等，与精子结合起稳定作用。在精浆中，含前列腺素的 Zn^{2+} 与射出的精子核蛋白 SH 基结合，因而可使核蛋白短时间稳定。如猫附睾尾部收获的鲜精获能和入卵要比射出的精子快得多。此外精子获能也是一个可逆过程。获能精子与精浆和附睾液接触，可去能 (decapacitation)，再进入雌性生殖道又可再获能。这种去能因子是一种糖蛋白 (40~200 kDa)。它们都是稳定精子膜，阻断 Ca^{2+} 内流，防止精子过早获能， Zn^{2+} 和精胺就有此作用。因此，精子洗涤对于精子的获能很重要。精子体外获能的第一步即是洗涤。经一次或多次洗涤离心后除去杂质、精清、死精子、低活力精子、冻精保护液及稀释液等。目前牛精子洗涤液用 BO 液和改良的 Tyrode's 液 (TALP)，山羊用不含 BSA 的 BO 液，猪多用 TCM199 液。精子洗涤后即是获能处理。主要用高离子强度液 (His)、 Ca^{2+} 载体和肝素等，以促进 Ca^{2+} 进入精子并刺激精子内部 pH 升高，从而诱发精子获能。

徐照学等 (1998) 用 BO 液上浮法对山羊冷冻精液的活精子进行分离，其受精率达 64.3%，效果明显优于 Peroll 分层液法 (49.0%)^[33]。任克良等 (2000) 用 MD-His 对家兔精子获能处理，卵裂率达 63.15%，并获得 1 只试管兔^[188]。张涌等 (1998) 分别用 BO 液和 MD-His 液处理山羊新鲜精液，受精率分别达 56.61%和 63.33%，表明二者均适宜于山羊精子获能处理^[42]。Smedt 等 (1992) 分别用 BO 液和 MD-His 液处理山羊新鲜精液，获较高的体外受精率 (56.7%和 57%)，Peroll 梯度离心法是近年使用较多的新方法^[31]。由于活精子在梯度中的沉降速度高于死精子，放 Peroll 离心处理后可获得较高浓度的精液，用于体外受精，使在一个同等体积、同等精子密度受精滴中加入更多的卵母细胞并维持较高卵裂率及囊胚率。

1.3.3 影响精子获能的物质

牛、猪、绵羊和山羊精子， Ca^{2+} 载体 IA23187 (IA) 诱导顶体反应较为有效，它与 Ca^{2+} 形成复合物，携其进入精子，从而诱发顶体反应并激活顶体酶系。Roldan 等 (1989) 使用 Ca^{2+} 载体 IA23187 处理羊精子引发顶体反应，可能是产生 DAG (二酰基甘油) 第二信使引起顶体反应^[189]。 Ca^{2+} 能刺激细胞的糖酵解过程，提供精子增加活力所需的能量，从而加强精子运动，特别是加强精子鞭毛运动。IA23187 能使 Ca^{2+} 聚集，使 Ca^{2+} 达到高浓度，当加入 IA23187 精子发生强而有力的鞭打式运动。旭日干 (1990) 首次利用载体 IA 处理山羊精子获能，得到试管山羊，并得出处理最佳条件是 IA23187 浓度为 0.5 μ M，处理时间为 2 min^[34]。

环磷酸腺苷 (cAMP) 与精子运动、获能和顶体反应有关。cAMP 与肌肉运动和鞭毛运动密切相关。cAMP 合成的物质如环化酶激动剂、磷酸二酯酶抑制剂都促进精子获能和顶体反应^[190]。咖啡因是磷酸二酯酶的抑制剂，使精子 cAMP 含量增加，从而促进精子获能，

促进细胞的氧化代谢和能量产生，从而发挥其促精子活力的作用，咖啡因还能延长精子寿命。如牛精子用含有 10 mmol/ml 咖啡因和 20 $\mu\text{g/ml}$ 肝素的 BO 液洗涤，培养，可使其获能。透明质酸 (hyaluronic acid 或 hyaluronan, HYA) 处理精子则趋于均匀分散状态，HYA 本身的高粘滞性所带来的细胞空间的适当渗透压防止细胞的聚集作用，从而防止局部聚集部位缺氧而导致的细胞死亡。HYA 与肝素协同作用，能够显著诱导牛精子获能，单独作用效果不明显^[191]，HYA 对精子或其它活细胞的作用，主要是通过调节渗透压、离子浓度等细胞外空间因素而间接起作用，并不是直接作用于细胞本身。

输卵管中的氨基多糖 (GAG) 也可促进精子对 Ca^{2+} 的吸收，诱发顶体反应。肝素是高度硫酸化的 GAG，牛精子获能最有效，最适剂量 10~100 $\mu\text{g/ml}$ 。获能液中也添加咖啡因、肾上腺素、亚牛磺酸等，提高精子活力，或抑制过氧化物对精子损害。在早期精子体外获能和发生顶体反应用一些生物活性液如卵泡或颗粒细胞液，后来用牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 代替。BSA 具有很强的结合胆固醇和 Zn^{2+} 能力，从而改变精子膜结构^[3]。BSA 通过转移磷脂酰胆碱而降低精子胆固醇。排卵时，有少部分卵泡液进入输卵管峡部，有利于精子激活、趋化、顶体反应和阻止多精入卵^[192]。总之， Ca^{2+} 、腺苷酸环化酶、cAMP、蛋白激酶和蛋白质磷酸化，是精子超激活必需的。在获能中和获能后，尾部表面失掉覆盖物，露出受体，被配体活化，激活 G 蛋白，钙通道活化，使 Ca^{2+} 短暂流入刺激腺苷酸环化酶，启动 cAMP 蛋白激酶的系列反应。同时也激活 Na^+/H^+ 通道，使细胞内 pH 上升。细胞内 Ca^{2+} 、 H^+ 与 cAMP 的浓度，可调节精子尾部运动，细胞内 Mg^{2+} 的浓度影响轴丝的硬度，使轴丝动力蛋白相互作用，在线粒体参与下，导致精子发生超激活运动^[189]。

2 体外受精

2.1 体外受精过程

成熟卵母细胞卵丘扩展明显，主要由颗粒细胞和细胞外基质组成，分泌精子趋化因子，吸引大量精子包裹。剧烈的运动和酶作用下，逐渐使颗粒细胞脱落，直至与卵母细胞透明带接触。颗粒细胞的存在可延长精子寿命，分泌诱导发生顶体反应的物质并且能阻止多精入卵，所以在体外受精时，颗粒细胞要有适当的保留。卵丘细胞也是活化诱导物。透明带蛋白筛选精子，哺乳动物卵母细胞的透明带由三种糖蛋白(ZP1、ZP2、ZP3)组成，其中 ZP3 是精子的特异受体，并且能触发顶体反应。受精时，精子首先与 ZP3 结合，ZP3 粘在精子头部并刺激精子顶体小泡胞吐。然后，顶体内层蛋白暴露于精子顶部，这种新暴露的蛋白质是精子细胞与精子受体偶联的配基，它使精卵细胞膜得以融合而发生受精^[3]。当去掉透明带，种间受精就无障碍，如人精子不能与仓鼠卵子结合，除去透明带后，则可穿入仓鼠卵。如小鼠精子和透明带结合，首先发生初级识别及 ZP3 和精子质膜上受体结合，诱发顶

体反应；然后是次级识别及精子发生顶体反应。精子质膜脱落，与 ZP2 结合，ZP1 主要起结构支撑作用。获能后精子在顶体反应中释放酶类，溶解卵丘间基质，解开细胞间的缝隙连接，使卵丘细胞离散，在卵丘细胞间有的精子未开始顶体反应，被卵丘细胞吞入胞质。这是清除质量较差精子和防止多精受精的另一种方式。部分穿入透明带后的精子顶体反应不完全，残留许多质膜和小泡，影响卵母细胞表层皮质颗粒释放，而导致多精入卵，影响卵裂率和发育率。体内自然受精时则没有这种情况。

2.2 影响体外受精的因素

体外受精不仅依赖于卵母细胞的成熟培养和精子获能，而精卵浓度、精卵相互作用的时间、培养液和培养箱 CO₂ 含量等也是重要影响因素。现在普遍使用 50~100 μl 微滴培养，对于受精时间，不同物种不同，而且卵母细胞外围颗粒细胞要保留，精卵比例要合适。牛是将 24h 培养成熟的卵母细胞放入已经过处理的获能精子微滴中，精子含量为 1.5~2×10⁶ 个/ml，38.5℃，5% CO₂，培养 44~46h，以分裂到 2~8-细胞阶段的胚胎作为受精结果评定。也可在培养 24h，观察放出第二极体，作为受精评定标准。镜检有卵丘收缩、脱落和卵周隙增大，判定为已受精。影响正常受精因素有：卵母细胞的质量、精液质量和获能效果、精卵共孵体系和比例。

受精液的影响。体外囊胚发育率的高低是衡量体外受精效率的一项重要技术指标，主要受两方面因素的影响，即受精卵的质量和体外共孵体系的有效性。MoCaffey 等 (1991) 报道，复合培养在输卵管上皮细胞单层上的体内受精卵（来自超排），其体外囊胚发育率可达 80%，而经 IVM-IVF 获得的受精卵，其体外囊胚发育率一般只有 20%~40%^[193]。说明目前的体外培养体系是有限的，而受精卵质量的高低是影响其在体外条件下继续发育的关键因素。谭世俭等 (1994) 研究，在简单的 Tyrode's 液加入一定浓度的 BT 液（0.6% BSA—TCM199，简称 BT 液）可以明显地提高体外受精卵的质量^[194]。而且 BT 液是在 IVF 的最初 24h 发挥作用的，如果 IVF 24h 后，再在受精液系统加入 BT 液则对受精卵和随后的囊胚发育没有影响。受精卵卵裂早期（IVF 后 24~72h），受精卵的发育对外界营养环境要求不高。Lu 等 (1987) 研究表明，牛卵母细胞经 24h IVM 后，92.2%到达核成熟的 MII 阶段，但有相当比率卵母细胞质的成熟并不同步^[195]。在 IVF 初期，部分尚未达到核质同步成熟的卵母细胞，可以继续富含营养成分的受精液中完成，主要是细胞质的成熟过程。相反，在 IVF 24h 后，精子已完成对卵母细胞的穿透，大部分已发育到原核阶段，这时受精卵在成分简单的 Tyrode's 液中必然影响受精效率和受精卵的继续发育。

发情羊灭活血清在绵羊体外受精过程中有重要作用。在受精液中添加发情羊血清，有利于绵羊精子体外获能，可以得到稳定的卵裂率。Huneau 等 (1994) 研究，绵羊精子在添加发情羊灭活血清的受精液孵育，精子膜上的胆固醇发生外流^[196]。发情羊灭活血清有利于

精卵相互作用和维持顶体反应后精子的“超活化运动状态”，还可以防止卵母细胞的透明带硬化，同时延长精子存活时间。此外，当受精液中含有发情羊灭活血清时，添加肝素对绵羊卵母细胞的体外受精没有促进作用，且高浓度的肝素（10 μg/ml）还有抑制作用。

3 胚胎培养（in vitro culture , IVC）体系

3.1 体内胚胎和体外胚胎发育的对比

虽然卵母细胞质量对胚胎发育起决定性作用，但外界环境也有很重要的影响。Naomi 等 (2001) 将 IVF 猪胚移入输卵管 6d 后，70%发育为囊胚，而且囊胚平均细胞数为 181.5，将同样的胚胎体外培养 2d 后，再移入体内和完全培养 6d，囊胚细胞平均数分别为 58.2 和 38.4，说明只要培养体系适宜，IVF 胚胎就能够正常发育，而且发育潜力很大^[197]。人 IVF 囊胚平均移植 2.4 枚，培养 3d 的胚胎移植平均为 4.6 枚，囊胚的植入率为 47%，而 3d 胚胎植入率仅为 20%。体外胚和体内胚在超微结构上也有很大不同。如体外培养的致密桑椹胚脂滴含量增加，而成熟的线粒体数目在减少，含有血清的培养液得到的胚胎，空泡化加重和核质比增加，而且胚胎体外发育速度比体内慢，牛 IVC 胚胎比体内胚胎发育慢一个周期，并且引起内细胞团（inner cell mass, ICM）细胞数比例下降。就移植成功率来说，ICM 比例要比胚胎细胞总数更为重要。IVC 胚胎透明带较体内胚胎的透明带对酶处理更加敏感^[198]，说明体外培养条件会影响透明带特性，从而影响胚胎孵化过程。此外 IVC 胚胎比体内胚胎对冷冻更为敏感。发现 IVC 胚胎与体内胚胎的透明带对酶消化反应不同，可能是体外培养改变了透明带对水和冷冻保护剂的渗透功能，而且 IVC 胚胎的密度比体内胚胎低。IVC 胚胎形态（脂滴样包含物多，细胞松散）和功能与体内胚不同，移植后存在妊娠率低，妊娠期长，胎儿出生重增加，易流产及心血管异常等缺点^[199]。因此，体外培养体系还有待进一步完善，IVF 胚胎数量和质量也需进一步提高。不论是体内猪胚胎还是 IVF 胚胎，都是通过糖酵解利用葡萄糖。IVF 胚胎培养到 8—细胞糖酵解明显增加。体内胚胎糖酵解在囊胚期才增加，但糖酵解活动强。在囊胚期通过三羧酸循环利用葡萄糖明显增加。通过三羧酸循环代谢丙酮酸、谷氨酰胺和葡萄糖，体内胚胎要比 IVC 胚胎强。

3.2 胞质的不完全成熟是早期胚胎发育阻滞的主要原因

未成熟卵母细胞虽然能在体外完成减数分裂过程，但只有少部分卵母细胞能发育为囊胚并具有妊娠能力，体外成熟卵母细胞的受精和胚胎发育能力低于体内成熟的卵母细胞^[200~202]。体外成熟培养时，卵母细胞生长发育阶段被人为地缩短是导致其胚胎发育潜力降低的原因之一，尤其是细胞质成熟的不完全。胞质的不完全成熟是早期胚胎发育阻滞的主要影响因素。哺乳动物卵母细胞的核成熟过程即使在简单的培养条件下也能自发地进行。

但卵母细胞能否获得正常的受精卵裂球及随后胚胎发育能力，主要与细胞质的同步成熟有关。体内激素水平紊乱或 IVM 培养条件不合适造成卵母细胞的严重畸形或微妙缺陷，使着床前后的胚胎停滞发育。“基因组激活”前胚胎的发育停滞是由于来自母源性的、与发育有关的物质消耗殆尽，而在胚胎发育开始时尚无胎源性的新产物来代替。母源细胞中母源蛋白不足导致胞质分裂停滞，而胞质成熟不完全导致卵裂球之间核仁转录延迟或活化不同步。发育停滞是由于卵母细胞母源性物质积累不足引起的，并影响以后发育过程中母源控制向胎源控制的过渡，或导致胚胎细胞核的异常编程。基因活化后一些母源信息参与着床前胚胎内细胞事件的控制^[203~205]。所以 IVM 对母源基因的实验程序设计不合理会导致胚胎发育母源控制阶段发育结束。Lantham (1998) 进一步认为受精前后卵母细胞胞质对胞核的异常编程可能导致其以后的发育阻滞^[206]。受精卵（胚胎）的发育阻滞通常发生在：牛羊 16-细胞期，猪 4-细胞期，小鼠 2-细胞期，这种体外发育障碍的存在，使体外受精技术得到的试管后代成功率低。解决阻滞发育的方法有：利用临时中间受体，将牛羊受精卵放入结扎的中间受体兔输卵管中继续发育 6~7d；体外受精卵与体细胞（输卵管上皮细胞）联合培养；利用合成输卵管液或在培养液中添加输卵管液（supplemental synthetic oviduct fluid, SOF）、BSA、氨基酸等。此外，输卵管细胞分泌物中提取促胚胎生长因子，以解决胚胎发育阻滞现象。

3.3 能量物质和蛋白质等有机物对胚胎发育的影响

3.3.1 能量物质对胚胎发育的影响

早期胚胎发育能量来源有两种机制：通过利用葡萄糖糖酵解途径和以丙酮酸或草酰乙酸为底物的氧化磷酸化途径。不同物种的生殖道，能量物质的浓度有差异。小鼠胚胎培养液通常用 CZB 液，猪胚胎多用 NCSU23，牛、绵羊、山羊胚胎较多用 SOF 和 CRI。这些培养液的共同特点是不含葡萄糖，代之以乳酸和/或丙酮酸为能量供应物。小鼠、仓鼠、绵羊、牛及人的早期胚胎在致密化之前，对葡萄糖的利用能力很有限，而主要以丙酮酸、乳酸和氨基酸为能量代谢的底物。致密化后，胚胎对葡萄糖的摄入和利用增加。

在不含氨基酸的条件培养液中，葡萄糖甚至会抑制胚胎早期卵裂。葡萄糖对早期胚胎发育的抑制作用与它在磷酸盐存在的情况下可以诱导细胞呼吸的抑制有关，呼吸的抑制会导致 ATP 产生效率下降，从而抑制乳酸/氨基酸介导的发育程序。胞内磷酸果糖激酶 (PFK) 水平与葡萄糖的利用相关，高 ATP:ADP 比值抑制 PFK；ATP:ADP 比值的变化反映细胞内生物合成活动的变化。胚胎基因组的激活、致密化的发生、胚泡的形成等事件伴随着细胞代谢活性的升高，这时 ATP:ADP 比率下降，葡萄糖的利用增加。早期胚胎虽然不以葡萄糖为能量底物，但葡萄糖或其通过磷酸戊糖途径代谢的残基参与一些物质如三酰甘油酯、磷

脂、核酸、NADPH 等的生物合成。自然情况下葡萄糖也存在于动物输卵管和子宫液中，所以体外培养液中低剂量葡萄糖的添加是必要的。半乳糖或 5.0 mM 的葡萄糖对胚胎发育有损伤作用，0.25 mM 果糖不仅具有与 0.5 mM 葡萄糖相同的对胚胎植入和胎儿存活的促进作用，而且还显示出能增加囊胚中细胞数量^[207]。

培养液中葡萄糖和磷酸盐对早期胚胎发育有抑制作用。如仓鼠胚胎发育阻断，葡萄糖和磷酸盐还降低呼吸和破坏线粒体结构^[208]。磷酸盐单独不影响仓鼠 8-细胞后胚胎发育，8-细胞前阶段，即使磷酸盐为 2.5 μM 也抑制胚胎发育。低浓度磷酸盐培养液中胚胎并不能改变三羧酸循环途径 (TCA-cycle)，线粒体在不同磷酸盐浓度有不同程度破坏，导致胚胎正常生理活动发生改变。囊胚的形成依赖于 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ ，磷酸盐存在时，囊腔早在 8-细胞就形成，磷酸盐增加了胞内 Ca^{2+} 水平。因此，磷酸盐通过使 Ca^{2+} 浓度增加促使囊胚形成，而且 Ca^{2+} 与细胞活动，如蛋白质合成、DNA 复制、线粒体活动和信息传递等有关。当葡萄糖加入 SOF 液时随着浓度增加，囊胚率下降，在无磷酸盐时也如此。但牛胚胎和仓鼠胚胎只有培养液中有磷酸盐时，葡萄糖才有抑制作用，无磷酸盐时葡萄糖并不能阻断胚胎发育。在许多哺乳动物胚胎中葡萄糖代谢方式相同，如人、绵羊、猪、牛等胚胎，牛胚胎在 8~16-细胞阶段葡萄糖代谢明显增加，这个时期也是胚胎基因组激活时期，而超排牛胚胎在 16-细胞后和桑椹胚期葡萄糖代谢才增强。

牛胚胎对乳酸浓度增加的承受能力比对丙酮酸强一些。丙酮酸和乳酸的比率对维持细胞内 NAD-NADH，对胚胎的抗氧化起平衡作用。乳酸不影响葡萄糖代谢，8-细胞后高浓度的乳酸能明显减少丙酮酸的吸收。在无乳酸培养液中，绵羊胚胎卵裂阶段，丙酮酸吸收量高，葡萄糖吸收量低；致密期后恰好相反^[209]。Narinder 等 (2000) 实验得出，牛体内胚胎和 IVF 胚胎的代谢过程基本相同，但也各有特点，如 IVF 牛胚胎囊胚产生的乳酸是同期体内胚胎的 2 倍。乳酸的产生维持胞内氧化还原态平衡^[210]。在牛输卵管液各能量物质的浓度为：葡萄糖 0.28 mM、乳酸 2.5 mM、丙酮酸 0.5 mM。丙酮酸与乳酸的代谢相互影响，当培养液含 2.5 mM 乳酸时，丙酮酸的利用率就下降。丙酮酸与乳酸的比例减小时，有利于牛胚胎发育，而抑制仓鼠胚胎的发育，也对马胚胎初期发育有抑制作用，马胚胎在囊胚以前主要以丙酮酸为能量来源。丙酮酸也是抗氧化剂，能减少胚胎对氧化应激的敏感程度^[211]。

Johnson 等 (1994) 表明，2-细胞发育阻断鼠胚胎中，琥珀酸脱氢酶活性明显降低^[212]。 H_2O_2 浓度在无磷酸盐培养液中未见明显变化，但在有磷酸盐时浓度会降低，此时正好处于发育阻滞期。含有葡萄糖和磷酸盐的培养液中，磷酸盐能激活糖酵解的关键酶，添加抑制染色体呼吸的酶，在无阻断胚胎中糖酵解酶无差异，但是在阻断的胚胎中，由于 H_2O_2 产生的降低和细胞色素氧化活动的改变而使呼吸代谢破坏。糖酵解活动在胚胎发育早期是不利的，但是通过降低或完全除去葡萄糖，或添加 EDTA 可降低糖酵解活动。添加 EDTA 可能螯合 Mg^{2+} ，调节糖酵解酶的活性。输卵管较子宫氧浓度高，糖浓度低，子宫更适合糖酵解。

3.3.2 蛋白质及生长因子对胚胎发育的影响

3.3.2.1 血清和 BSA 对胚胎发育的影响及无血清培养

血清是胚胎培养中添加的主要蛋白质源物质，它在保持细胞存活、促进生长、维持细胞 pH 及渗透压的稳定、增加细胞弹性及膜的完整性等方面都发挥重要作用，但血清组成复杂，含有许多营养物质，如蛋白质、氨基酸、碳水化合物、微量元素、激素、生长因子、细胞粘着和扩展因子及不确定因子等^[213]。血清成分的多样性决定它对胚胎的影响也是复杂多元的。血清的存在对胚胎最初发育有损害作用，而对后期胚胎的发育有利，因此许多研究中血清是在胚胎培养 24~48h 后加入。当培养液中有血清时，胚胎颜色变暗，有颗粒及脂样小泡，而且增加糖酵解率，使 ICM 与滋养层之间的连接复合体不完整。血清还会影响胚胎冷冻效果，牛胚胎在含血清 M199 中培养，虽然能得到更多的囊胚发育率，但这些胚胎冷冻后的存活率低，而且再培养后细胞数的增加量也明显低于无血清培养液获得的胚胎。血清成分复杂，虽然能给胚胎提供生长因子，但可能引起代谢产物氨浓度的升高，并且可能是导致大胎综合征的原因之一^[214]。在无血清条件培养胚胎，第一次卵裂和第四次卵裂时间延长，而有血清培养时，仅第四次卵裂延长，而且易出现早熟囊腔，但出现的正常囊胚也比无血清培养基早 16~18h^[215, 216]。培养液中添加血清增加了胚胎脂滴，且能改变线粒体的结构，所以受精后 3d 内不加血清，能生产高质量的胚胎^[217]。

BSA 是培养液中常用的一种蛋白源物质，能结合培养液中的一些胚胎毒性物质，对胚胎有保护作用，它也能增加胚胎中的细胞数量。单独使用 BSA 并不能完全取代血清的作用，说明血清中其他一些有用因子不包括在 BSA 中。血清存在的情况下，BSA 的加入能促进胚胎的发育。大分子物质如聚乙烯醇 (polyvinyl alcohol, PVA) 被用来代替 BSA 添加入培养液，也能取得胚胎发育。PVA 是一种人工合成的大分子物质，可以避免胚胎在无蛋白培养液内发生粘连，但非蛋白大分子物没有营养功能，胚胎在这种环境下，一些代谢活动会受到损害。3N-2-硝基酚钠以非毒性水平加入培养液，或以 2% O₂ 的空气环境培养，不仅能提高囊胚发育率 10%~20%，而且囊胚的质量也高^[218]。

透明质酸也是一种可用于胚胎培养的大分子物质。透明质酸和 BSA 协同作用能增加牛胚胎细胞数量和囊胚的孵化能力，有利于胚胎进一步发育，移植液中加入透明质酸能显著提高胚胎植入率和胎儿发育率。猪体外受精胚用含透明质酸的培养液培养受精，可以极显著地提高正常受精率；透明质酸以 0.5 mg/ml 浓度添加显著提高囊胚发育率。

柠檬酸钠和肌醇也可与 PVA 配合使用，取代血清及 BSA。柠檬酸钠 + 肌醇 + PVA 加入 SOFaa 培养牛胚胎，与 SOFaa-血清、SOFaa-BSA 及 M199-颗粒细胞共培养相比，囊胚发育率以及囊胚质量都没有显著差异。柠檬酸可以调节脂肪酸合成，并能络合重金属离子以及转运溶质^[219~221]。

另外，非离子型表面活性剂 Twin-80 虽没有胚胎营养功能，但可完全替代血清的表面活性功能，并有利于生长因子发挥作用。Twin-80 配合使用 20 $\mu\text{g/ml}$ EGF，能取得与 5% 或 10% 血清相同的囊胚发育效果^[164]。

3.3.2.2 生长因子对胚胎发育的影响

IGF-I、IGF-II 及其受体基因在早期胚胎中表达，IGF-I 在输卵管及子宫分泌物中存在^[222]，IGF、Insulin 在胚胎发育中起作用。IGF-I 或 Insulin 能阻止细胞凋亡，促进细胞增殖，对胚胎发育有利。EGF 是血清和卵泡液中都存在的生长因子，无血清培养液中加入 EGF 能促进牛胚胎发育，增加蛋白质合成和囊胚孵化，但不增加囊胚中的细胞数量，也有研究发现 EGF 也能增加细胞数量。IGF-I 对不同哺乳动物卵母细胞和胚胎发育有明显影响。培养液中添加 IGF-I 降低细胞凋亡和促进细胞分裂^[223]。在无血清培养基中，IGF-I 作用显著。低浓度 IGF-I 也被证实能改善鼠、人、兔胚胎的囊胚发育率。哺乳动物胚胎中表达 IGF-I 受体蛋白^[224]。在 1-细胞牛胚胎中，就有 GH 或 IGF-I mRNA 存在，而且 IGF-I 在输卵管浓度在胚胎卵裂期就增加^[225]。添加 GH 或 IGF-I 能提高囊胚率及扩张和孵化率。牛早期胚胎不能合成 IGF-I，是通过旁分泌产生 IGF-I。

胰岛素对小鼠、猪胚胎发育均有促进作用。经间接免疫荧光分析，小鼠胚胎细胞膜上胰岛素受体是在发育至桑椹胚和囊胚阶段才出现，未受精卵、2-细胞、4-细胞和 8-细胞上均无荧光标记。通过 PCR 分析发现绵羊胚胎在早期发育的所有阶段均有胰岛素受体，而在绵羊早期胚胎发育过程中没有检测到胰岛素基因的转录。这表明小鼠仅发育至 8-细胞后才受胰岛素的调节作用，而牛、羊胚胎在发育全阶段都受到胰岛素调节。胰岛素能通过促进桑椹胚和囊胚期 RNA 和 DNA 的合成、氨基酸的转运和葡萄糖代谢来促进胚胎发育。

ITS (insulin-transferrin-selenium 是一种胰岛素、转铁蛋白和亚硒酸钠的混合物) 添加能促进牛胚胎的发育^[164]。VEGF (vascular endothelial growth factor, 血管内皮生长因子) 是卵泡液中存在的一种促生长因子，其浓度随卵泡的发育而增加。牛卵母细胞成熟液和胚胎培养液中添加 VEGF 都能促进胚胎早期发育，主要表现在显著增加 4~8-细胞胚胎发育率，对此后胚胎的发育没有影响。Sabine (2001) 发现 GHR (生长激素受体) 基因在 2d 牛胚胎中转录，6d 时其 mRNA 合成是 2d 时的 5.9 倍^[226]。原位杂交试验表明 GHR mRNA 主要集中在囊胚内细胞团。GHR 蛋白在胚胎中也有表达。通过电镜观察，GH 使 6~8d 胚胎糖原储存减少，脂质胞吐增加，说明 GHR 能调节碳水化合物和脂质代谢。Mtago (2003) 报道生长因子和 GH 有益于牛卵母细胞成熟和发育、而且增加胚胎解冻后的存活率^[227]。细胞因子也是其中发挥功能的重要方面。这些细胞因子主要是白细胞介素-1 (interleukin 1) 家族的成员。在早期妊娠阶段，胚胎和生殖道都会产生 IL-1 β 、IL-1RA、IL-1 等的 I 型受体存在于卵母细胞和囊胚期前的各期胚胎中。

3.3.3 氨基酸及粘多糖对胚胎发育的影响

动物输卵管和子宫液都有相当数量的自由氨基酸，早期胚胎也存在一些特殊氨基酸载体，胞内具有内源性氨基酸池，体外培养加入氨基酸可克服胚胎发育阻滞，不仅能促进胚胎早期发育，而且增强其植入后的发育能力。在胚胎和卵母细胞膜上存在特异的氨基酸（amino acid, AA）载体，当胚胎分化形成内细胞团和滋养层，即囊胚形成时，加入 AA 可满足蛋白质合成需要，这对胚胎正常发育是必要的。胚胎在不同发育阶段需要不同数量和不同种类的氨基酸。Eagle 氏氨基酸最初是用于培养体细胞的。后发现在培养液中加入非必需氨基酸（NEAA），提高许多动物胚胎发育能力^[228]，如 NEAA 诱导囊胚形成，提高绵羊胚胎的囊胚发育率，但与含血清的培养液相比，每个胚胎的细胞数少。Eagle 氏必需氨基酸（EAA）在动物生殖道中浓度很低。胚胎致密化之前，必需氨基酸没有作用，甚至对胚胎发育产生副作用。但 EAA 对后期胚胎的发育有促进作用，主要表现在增加内细胞团细胞分裂率和植入后胎儿发育能力。如 Spindle 等 (1972) 研究表明 EAA 中有些 AA 对胚胎发育有利^[229]，张家新等表明 EAA 对促进绵羊囊胚的孵化，但对绵羊桑椹胚前的胚胎发育没有促进作用。Eppig 等 (1994) 以 KSOM 为基础培养液并添加 $0.5 \times \text{EAA}$ 和 $0.5 \times \text{NEAA}$ 培养小鼠，囊胚率和囊胚孵化率明显提高。张家新等表明， $0.5 \times \text{EAA} + 1 \times \text{NEAA}$ 适于绵羊胚胎体外培养^[230]。

NEAA 和谷氨酰胺对致密化后期胚胎的发育也有利，能促进胚胎向囊胚发育和胚泡形成，并增加滋养层细胞数量和囊胚的孵化能力^[231]。NEAA 和谷氨酰胺对胚胎发育的保护和促进作用是通过调节胚胎的能量代谢，通过抑制糖分解活性来降低葡萄糖对早期胚胎发育的有害作用。还能调节渗透压，保持细胞内生理稳定。在致密化前期对胚胎发育的作用有协同性，谷氨酰胺单独添加不会对牛胚胎向 8~16 细胞发育产生促进作用，NEAA 配合使用谷氨酰胺会增强作用效果。在这一阶段，谷氨酰胺的主要作用是维持渗透压平衡。致密化后期，谷氨酰胺主要被用来作为能量供应物，维持渗透平衡的作用降低。

KSOM-PVA(氮源是谷氨酰胺)能支持约 70% 的小鼠胚胎发育到囊胚阶段，而 KSOM-PVA-AA 能将囊胚率提高到 90%。牛胚胎在发育过程中，对氨基酸的需求也有变化，在发育早期，需要非必需 AA 和谷氨酰胺。4d 后才需要必需 AA，增加囊胚的形成和细胞数。AA 可作为能量底物和 pH 稳定因素，促进胚胎的发育，有利于内细胞团细胞数增加^[232]，但不能抑制囊胚细胞凋亡。小鼠卵母细胞和胚胎中具有内源性的氨基酸池和特殊氨基酸转运系统，子宫液含有一定水平的自由氨基酸。

尽管无氨基酸培养液也能使胚胎发育到囊胚阶段，但添加氨基酸有利于改善胚胎发育。兔输卵管液含有较高水平的甘氨酸、丙氨酸、苏氨酸、谷氨酸和丝氨酸。人和小鼠输卵管液也含有高水平的谷氨酰胺。Bavister 等 (1995) 发现天冬氨酸、甘氨酸、组氨酸或丝氨酸对仓鼠胚胎有激活作用，而半胱氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸和缬氨酸则有抑制作用

[233]。氨基酸在常温下要降解释放氨，对胚胎有伤害作用。因此培养液中添加氨基酸时，要低温保存，而且在培养过程中，培养液要每隔 48h 换液一次。

添加 1 mg/ml 的透明质酸 (HA) 能明显提高牛囊胚发育率。但不能提高囊胚细胞数和冷冻后的存活率。粘多糖 (GAGs) 如硫酸肝素、和硫酸软骨素在母畜生殖道内大量存在，GAGs 在细胞分化方面有重要作用。此外存在于细胞表面的 GAGs 粘着一些分子如脂质、生长因子等调节细胞的功能和形态。HA 广泛存在于细胞表面，并且在子宫角，输卵管及卵泡液有大量粘多糖存在。CD44 是 HA 的受体，在人植入前胚胎表达，也在小鼠胚胎和胚胎干细胞中表达^[234]。

3.4 抗氧化作用

胚胎代谢过程产生的活性氧系 (reactive oxygen species, ROS) 能改变细胞内的一些成分，对胚胎发育有阻滞或延迟效果，体内胚胎细胞有多种保护氧化作用的机制，卵泡或生殖道内有亚牛磺酸、牛磺酸以及维生素 C 等物质，这些非酶性物质对胚胎有抗氧化效应。细胞内抗氧化作用主要通过一些抗氧化酶实现，卵母细胞及胚胎细胞内都有超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶、谷氨酰半胱氨酸合成酶等物质的转录，这些酶对胚胎正常发育是不可缺少的^[235]。

子宫角和输卵管是低氧环境，子宫比输卵管氧浓度更低^[236]，所以将高氧 (空气) 作为氧源，在培养中易产生 ROS 对细胞和胚胎造成毒害作用，如 DNA 裂解、脂质过氧化、蛋白质氧化。为降低培养液中 ROS 浓度，添加一些低分子量的巯基化合物，如 β -ME、半胱氨酸、半胱胺等这些有利于 GSH 前体的合成。在体内，有稳定的氧化还原平衡系统，能抑制 ROS 的积累。其中包括酶催化，如 Cu-Zn 和 Mn 超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶。有些哺乳动物的早期胚胎也表达此类酶。但是 ROS 也可能有第二信使的作用。有些基因表达与 ROS 浓度有关。包括蛋白激酶、酪氨酸激酶和生长因子等。在牛胚胎激活时即 8-细胞期出现短暂的 H_2O_2 脉冲，对牛囊胚发育可能有积极的作用。ROS 也可能对囊胚细胞凋亡有作用。降低氧浓度比使用还原酶更有利于胚胎的发育。总之，降低氧气浓度更有利于胚胎的发育，而且胚胎细胞数和囊胚率增加。这也主要得益于降低 ROS^[237]。

许多研究表明低氧环境更有利于牛胚胎发育，但自由基清除剂存在时，高氧环境同样支持胚胎正常发育^[238]。 β -ME (β -巯基乙醇) 与胞内 GSH (谷胱甘肽) 合成有关，GSH 则是胞内重要的氧化还原平衡剂，清除氧自由基。谷胱甘肽(GSH)是一种生物体内应用的抗氧化剂。体外培养液中添加 GSH 对小鼠、牛、山羊胚胎发育有促进作用。GSH 在体外培养时对牛、山羊胚胎发育的保护和促进作用主要发生在 8~16-细胞期。GSH 的作用依赖于 BSA 或其它蛋白质。GSH 还会增加胚胎对温度升高的耐受性，这种保护作用对移植后胚胎

的存活和发育有重要作用，因为着床期子宫的高温压力会提高胚胎死亡的可能性。GSH 是由甘氨酸、胱氨酸和谷氨酰胺合成的三肽分子，是细胞内氧化还原态的重要调节剂。在母畜生殖道中也有 GSH 存在^[239]。胚胎直到囊胚时才获得自身合成 GSH 的能力，在体内主要通过卵母细胞成熟过程中合成并积累和生殖道分泌的 GSH 对抗 ROS。GSH 的合成取决于培养基中半胱氨酸，但是半胱氨酸很易被氧化为胱氨酸，细胞就不易吸收，导致细胞分裂能力下降和胞内 GSH 浓度下降。培养基中添加 β -ME 能促进细胞对胱氨酸吸收，GSH 浓度升高，细胞增殖加快。卵母细胞成熟液中加 5 μ M β -ME 和亚牛磺酸也能提高卵母细胞中 GSH 的浓度，且成熟率高。 β -ME 能提高正常受精率，但是不能显著提高囊胚的发育率^[240]。

牛磺酸用于体外培养时，只有在无血清或 BSA 的培养液中才会对胚胎发育有利。降低 O₂ 浓度也可以提高人胚胎囊胚发育率和囊胚中细胞的数量，牛胚胎在 5% O₂ 环境下培养，较常用的 20% O₂ 环境能获得更多囊胚发育率和孵化率，桑/囊胚中的细胞数量也显著增加。小鼠胚胎 5% O₂ 浓度能明显提高囊胚发育率以及 ICM 细胞数量，囊胚中葡萄糖的分解活性和丙酮酸的氧化活性也明显增强^[241]。

3.5 培养液及共培养体系对胚胎发育的影响

3.5.1 培养液对胚胎发育的影响

培养液的配制成分对胚胎发育有重要影响。如小鼠胚胎使用 CZB 培养液较为理想，能有效克服胚胎发育阻滞。CZB 是发现葡萄糖对胚胎发育抑制作用后，采取谷氨酰胺取代葡萄糖，并加入 EDTA 配制而成。猪胚胎培养使用 NCSU23 比较好，能支持胚胎发育到囊胚。PZM (porcine zygote medium) 是一种限定性培养液，也能使猪胚胎发育到囊胚阶段，而且比 NCSU23 要好^[242]。Swain 等 (2001) 使用 NCSU23 和 G1.2/2.2 培养猪胚胎，发现在卵裂率和囊胚发育率方面，NCSU23 要优于 G1.2/2.2^[243]。Kuran 等 (2001) 用 SOF 作为基础培养液，分别添加 10% FCS、4 mg/ml BSA 和 3mg/ml PVA 培养牛胚胎，卵裂率在含血清中最低 (61%)，含 BSA 次之 (76%)，含 PVA 较高 (72%)，但含 PVA 在 7d 囊胚率仅为 12%，8d 为 21%，比含血清的培养液 (分别是 33%、40%) 和含 BSA 培养液 (分别是 30%、37%) 的囊胚率都低。在 BSA 培养液中囊胚直径和内细胞团细胞数比其它两种培养液高^[199]。Gutierrez 得出，含有 10% FCS 的 SOF 比无血清培养液培养的胚胎发育快且囊胚率高 (47.5%、34.4%)，但增加雄性胚胎的比例。

3.5.2 共培养体系对胚胎发育的影响

共同培养(co-culture)是应用辅助细胞或饲养细胞与胚胎在体外一起培养,该培养系统可以促进胚胎发育，使囊胚形成率得到提高。体细胞共培养体系能改善胚胎发育，顺利通过

阻滞，因为体细胞产生促分裂因子，分泌胚胎营养因子和促进胚胎细胞分化因子，并清除培养液中的毒性代谢产物^[244~246]。用于共培养的体细胞类型很多，如牛输卵管上皮细胞(BOEC)、颗粒/卵丘细胞(GCs)、子宫内膜细胞、成纤维细胞和水牛和大鼠肝细胞。建系的细胞如 BRL(buffalo rat liver cells, BRLs)和 Vero cells(绿猴肾细胞)等因其单一无病原成为常用的共培养细胞。Pegoraro 等 (1998) 分别用 BOEC 和 Vero 共培养体系培养牛胚胎，发现 Vero 优于 BOEC 体系^[247]。Rizos 等 (2001) 得出，用 SOF 培养牛胚胎比 TCM-199-GCM (颗粒细胞单层) 系统囊胚发育率显著高^[248]。TCM199-GCM 培养的囊胚冷冻解冻后培养 72h，胚胎存活率比 SOF 培养的囊胚要高，而且共培养体系能增加囊胚耐冷冻能力。因此，我们可以根据胚胎发育的特点，适时、适量的调整培养基成份，使其更适合于胚胎发育。序贯培养就是根据体外培养的胚胎在不同生长时期对不同物质需求和代谢的不同，采取针对不同发育时期胚胎用不同培养基。G1.2/2.2 就是根据能量变化设计的阶段培养液^[249]。这个培养体系不仅支持人胚胎的发育，而且也用于牛、羊等家畜胚胎培养。CDM (a chemically defined medium) 也是一种阶段培养基。CDM1 含有 NEAA 和 0.5 mM 果糖；CDM2 含有 NEAA、EAA 和 2 mM 果糖^[240]。

3.6 物理因素对胚胎发育的影响

3.6.1 氧气浓度和无机离子及渗透压对胚胎发育的影响

母畜生殖道 (子宫和输卵管) 是低氧环境,约 3.5~8.5% O₂。Hiroyoshi 等 (2001) 用 5% O₂ 和低糖 (2.22 mM 葡萄糖) 能改善牛胚胎发育^[250]。在致密期后，将氧浓度降为 2% 更有利于胚胎发育。Thomsonm (2000) 得出氧优化浓度为 2%，在培养液中添加低浓度 5~10 μM NaN₃ (氧化磷酸化抑制剂)，或 1 μM 的 2, 4-二硝基苯胍 (偶联抑制剂) 能明显刺激胚胎发到囊胚阶段，且细胞数增加^[251]。随着 NaN₃ 浓度增加，O₂ 吸收显著减少，葡萄糖吸收量呈线性增加。说明经过氧化磷酸化产生 ATP 是牛胚体外发育的本质。但 Koji 等 (2002) 发现在 20% 和 5% 氧环境 NCSU-23 对猪胚胎发育影响不显著^[252]。Kazuhiro 等 (2002) 得出同样结论，但内细胞团细胞数增加^[253]。又如用 NCSU-23，在 20% O₂ 下，培养得到可用胚数和囊胚总数要比低氧环境 5% 得到的高。Zarie 等 (2002) 通过降低细胞氧应激，染色体自发碎裂被抑制^[254]。相反，在转基因小鼠中，通过过度的表达抗氧化酶，提高反应氧的水平，就会增加染色体的碎裂度。在人、牛、羊等动物胚胎培养中，现在一致认为 5% CO₂ 较为理想的气相环境。

培养液适宜的渗透压、钠钾比例、钙镁比例、磷酸盐缓冲系统等都与胚胎发育有直接的关系。哺乳动物输卵管液以高浓度的 K⁺ 和 Cl⁻ 为特征。培养液中高浓度 K⁺ 对精子获能和胚胎发育有益。在不同动物的生殖道中离子浓度和物理环境还是有差异的。如猪输卵管液中，K⁺ 浓度 12.4 mM，比绵羊 (8.12 mM) 和牛 (4.53 mM) 高。培养液中 Na⁺/K⁺ 比显著

影响牛胚胎的发育。 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 同样为胚胎发育所必需。渗透压对胚胎发育也有影响, 普通情况下, 250~300 mosm 较为理想。Nguyen 等 (2003) 得出渗透压 Na^+/K^+ 比对猪胚胎发育到囊胚影响更大^[255]。优化渗透压 4-细胞前为 290 (280~320) mosm, 之后为 256 (220~270) mosm。目前, 大多数胚胎培养液用 $\text{NaHCO}_3/\text{CO}_2$ 缓冲系统以维持生理性的 pH (7.2~7.4)。培养液含 NaHCO_3 是与气相培养箱中 5% CO_2 维持平衡, 也是体液生理缓冲系统, 在体外, 空气易使 pH 升高, 损伤胚胎, 常用磷酸盐缓冲液替代。

3.6.2 其它方面的影响

在炎热的夏季, 由于气温普遍高, 动物热应激而使生殖机能下降, 胚胎发育也会受到热应激影响, 发育能力下降。但胚胎也有一定的抗热应激能力。Paula-lobes 等 (2002) 用 TUNEL 反应试验表明, 41℃或 42℃不能诱导 2~4-细胞牛胚胎凋亡^[256]。8~16-细胞依赖于胚胎发育速度, 如发育 3d 的 8~16-细胞胚胎在 41℃下诱导 9h 不凋亡, 而发育 4d 的 8~16-细胞胚胎有凋亡趋势。而当 4d 的 8~16-细胞的胚胎预先在 40℃下放置 80 min 后, 能够阻止在 41℃、9h 的凋亡现象。说明温度能诱导胚胎细胞凋亡, 但胚胎也有一定的抗热应激能力。Azambuja 等 (1998) 将卵母细胞置于不同温度 5~20 min, 发现随着温度下降, 其卵裂率也下降, 胚胎的发育能力也下降^[257]。温度影响胚胎质量与品种有关, 高温和高湿对荷斯坦牛的卵母细胞和胚胎质量有不良影响。在体外操作过程中, 时间越短越好。室温不能过低, 培养箱中的温度应与动物体温一致。

除去胚胎外周颗粒细胞的方法对胚胎发育有影响^[247]。将胚胎高速离心, 除去脂质对胚胎发育无影响, 而且提高猪和牛胚胎的耐冷冻能力。因为在 IVC 过程中, 胚胎脂质积蓄快, 破坏了胚胎的正常代谢^[216]。此外如果体外操作时间较长, 光线较亮也易对胚胎发育造成不良影响。培养液中含有蛋白质或其它大分子物质, 有利于胚胎操作。如果没有蛋白质, PVA 或其它表面活性剂, 胚胎难以操作, 易粘在培养皿或吸管壁上。

小 结

近年来, 哺乳动物 IVM、IVF 和 IVC 的研究已取得了很大的成绩。随着生物技术的发展和对卵母细胞成熟、控制机理、IVM、IVF 及 IVC 所需营养促生长因子等方面的深入研究与探讨, 可以充分利用能够维持不同发育阶段卵母细胞在体外生长发育的培养体系, 有效地研究各种因子/因素对卵母细胞生长发育的调控机制, 阐明参与卵母细胞生长过程以及卵泡细胞间信息通讯的分子机制, 建立和完善更易于卵母细胞体外发育的培养体系。与冷冻保存技术相结合, 为建立“未成熟卵母细胞库”和在体外生产大量具有发育能力的卵母细胞奠定基础。进一步发挥 IVF 和 IVC 技术, 为加快良种繁育、濒危动物挽救、生产转基因动物、克隆动物、人类辅助生殖、家畜品种国际间交流与运输等方面作出巨大贡献。目

前胚胎生产的技术路线仅限于实验室阶段，尚不能应用于生产，体外获得胚的质量和体内正常胚胎发育能力相比差异很大。随着科技的发展和实验技能的不断改进，相信 IVM、IVF 和 IVC 技术将会得到进一步的完善，从而为现代生物工程技术和畜牧业生产提供更多的胚胎来源和相关技术。

第三节 哺乳动物胚胎干细胞的研究进展及应用前景

干细胞是指那些具有无限增殖或可被延长自我修复能力的细胞，它们能分化为机体至少一种类型的细胞。胚胎干 (embryonic stem, ES) 细胞，是从附植前胚胎早期内细胞团 (inner cell mass, ICM) 经抑制分化培养分离得到的，具有体外培养无限增殖、自我更新和分化为三个胚层组织细胞能力的一种多能性干细胞，因而被称为“万能细胞”。ES 细胞通过核移植或胚胎嵌合，得到克隆动物，可提高优良家畜的繁育效率，对拯救濒危动物有重要作用。同时，ES 细胞在体外，可进行冻存及遗传操作，在特定条件下可诱导分化为人们所需要的细胞、组织、器官等用于临床治疗。由于 ES 细胞这些诱人的应用前景，有关其研究成果于 1999 年、2000 年连续两年被评为世界十大科技新闻。ES 细胞的研究必将引起人类临床医学的一场革命。

1 胚胎干细胞的生物学特性

自 1981 年小鼠 ES 细胞系成功建立以来，已有 20 多年的历史。胚胎干细胞的研究和应用已渗透到发育生物学、免疫学、生殖生物学、神经生物学、细胞生物学、遗传学、医学等多个领域，胚胎干细胞的广泛应用是与其自身的独特特性紧密相关的。胚胎干细胞具有如下生物学特性：

(1) 胚胎干细胞来自正常的胚胎，具有完整的二倍体核型。

(2) 胚胎干细胞在形态上具有典型的干细胞特征。体积小、核大、胞浆少、有 1~2 个核仁，细胞与细胞紧密地聚集在一起，细胞间界限不清，呈集落型生长，形似鸟巢，集落边缘清晰，折光性强。

(3) 胚胎干细胞在基因表达模式上类似于 ICM 细胞。胚胎干细胞表达早期胚胎细胞特异表达的基因，如碱性磷酸酶(AKP)、高端粒酶活性。从其基因表达来看，胚胎干细胞类似于晚期 ICM 细胞^[258]。就胚胎干细胞本身各种特性而言，接近于 5.5d 胚胎原始外胚层细胞。胚胎干细胞表达 5.5d 胚胎原始外胚层细胞的表面抗原，如 Forssman 抗原存在于胚胎干细胞、晚期桑椹胚和 ICM 细胞，但不存在于 6.5d 胚龄的胚胎外胚层细胞。

(4) 胚胎干细胞具有无限增殖的能力。在适宜的条件下，如放在饲养层上或含有分化抑

制因子的培养基中，胚胎可稳定传代，长期培养。

(5) 胚胎干细胞具有广泛的体外分化能力。需要生长在饲养层细胞上或含有分化抑制因子的培养基中培养才能维持其未分化状态，当撤掉这些分化抑制因素或加入诱导分化的药物时，胚胎干细胞可分化成来自三个胚层的细胞。悬浮培养时，胚胎干细胞聚集形成类胚，这一过程类似于早期胚胎发育。类胚体外的细胞分化为原始内胚层，内部未分化细胞则发育到接近于原始外胚层细胞的状态。类胚继续悬浮培养，可形成囊状类胚，其中含有来源于三个胚层的多种分化细胞。

(6) 胚胎干细胞具有广泛的体内分化能力。将胚胎干细胞接种同种动物或小鼠体内，可分化产生由多种不同组织组成的畸胎瘤，包括来源于三个胚层的细胞。

(7) 胚胎干细胞具有种系传递功能。若把胚胎干细胞注射到受体胚胎内，胚胎干细胞可广泛参与胚胎各组织和器官的发育并获得嵌合体。胚胎干细胞甚至能参与胚胎生殖细胞的发育，形成种系嵌合体，通过育种可以获得带有胚胎干细胞遗传性状的后代，此即为胚胎干细胞的种系传递功能^[259]。

(8) 胚胎干细胞具有培养细胞所有的特征，可在体外培养、克隆、冻存及进行遗传操作如导入基因、标志基因或异源基因；加入额外的原有基因使之过表达（增加功能）；通过质粒 DNA 与染色体上有关基因序列发生同源重组剔除该基因，即基因打靶（失去功能）以及诱导基因突变。胚胎干细胞经遗传操作后一般仍能保持其扩增和发育多/潜能性，因此可以通过它制备转基因或基因有缺失、突变或过表达的杂合或纯合动物进行各种功能分析^[260]。

2 各种动物 ES 细胞的研究进展

2.1 小鼠 ES 细胞的研究进展

目前，小鼠 ES 细胞的分离方法基本成熟，且已广泛用于生命科学研究的各个领域。Evans 和 Kaufman (1981) 首次分离得到小鼠 ES 细胞，他们以手术切除受精后 2.5d 小鼠卵巢并结合激素注射干扰子宫环境，从而使胚胎延迟着床，再回收胚胎，体外培养于 STO (STO 细胞是 SIM 小鼠 (S) 胚胎对硫代鸟嘌呤 (thioguanine, T) 和乌本苷 (ouabain, O); 有抗性的成纤维细胞系) 细胞饲养层上，得到了小鼠 ES 细胞系^[261]。同年，Martin 等 (1981) 以免疫外科法去除小鼠囊胚滋养层细胞，得到 ICM 并将其培养在 STO 细胞饲养层上，结果也得到小鼠 ES 细胞系^[262]。Axelrod 等 (1984) 用微滴法得到小鼠 ES 细胞系^[263]。Kaufman 等 (1983) 用延迟着床小鼠囊胚建立同源二倍体 ES 细胞系^[264]。Wobus 等 (1984) 首次用原代小鼠胎儿成纤维细胞 (primary mouse embryonic fibroblasts, PMEF) 作饲养层建立小鼠 ES 细胞系^[265]。Brook 等 (1997) 进一步完善小鼠 ES 细胞的分离方法，从许多品系小鼠 (包括近交系和突变系) 都可获得 ES 细胞 (在此之前，绝大多数小鼠 ES 细胞均来自 129 品系)^[266]。

Tojo 等 (1995) 用同样方法从杂交小鼠 (C57BL/6×DBA/2) 8-细胞胚胎中也得到了 ES 细胞^[267]。Pease 等 (1994) 借助重组 LIF 因子代替成纤维细胞饲养层, 直接从 129/SV 小鼠扩张囊胚分离得到 3 个 ES 细胞系 (MBL-1、MBL-2、MBL-3); 从经过免疫外科法处理的囊胚中得到 2 个 ES 细胞系 (MBL-4、MBL-5)^[268]。其中 3 个细胞系包含 Y 染色体(MBL-1、MBL-2、MBL-5), 且具有正常的二倍体核型和染色体数目。所有的 ES 细胞系都表达碱性磷酸酶(AKP)和干细胞标记(ECMA-7), 当去掉 LIF 后, 它们能分化形成多种细胞类型, 注入囊胚则能形成高比例的、包括生殖系在内的嵌合体小鼠。

随着细胞核移植技术的飞速发展, 人们已经能从核移植胚胎中分离建立 ES 细胞系。Munsie 等 (2000) 从以小鼠颗粒细胞为核供体构建的重组胚 ICM 中分离出了核移植 ES (nuclear transfer embryonic stem, ntES) 细胞, 它具有正常小鼠细胞的形态特征和细胞表面标记, 在畸胎瘤和嵌合体胎儿中, ntES 细胞参与了三胚层组织的形成。在体外培养条件下, ntES 细胞可形成肌肉组织和有功能的神经元^[269]。此后, Kawase 等 (2000) 又以神经细胞为核供体, 从核移植构建的重组胚中, 分离得到了小鼠 ntES 细胞, 它具有小鼠 ES 细胞的细胞表面标记, AKP 呈阳性, 核型正常, 能分化形成多种细胞类型^[270]。虽然这种 ntES 细胞的核来自神经细胞, 但它并不表现神经细胞的特征, 然而它却能分化形成神经细胞。Wakayama 等 (1999) 分别以近交系、杂交系和突变系小鼠成年体细胞 (颗粒细胞和成纤维细胞) 为核供体, 以去核卵母细胞为受体, 建立了 35 个小鼠核移植 ES 细胞系, 这些 ntES 细胞在体外能分化为许多细胞类型, 包括多巴胺神经元和 5-羟色胺神经元。在体内能分化为生殖细胞, 若以 ntES 细胞为核供体, 能产生有生殖能力的克隆后代, 证明了 ntES 细胞的多能性^[271]。

国内, 丛笑倩等 (1987) 最早分离并建立了 129×C3H 小鼠 ES 细胞系^[272], 随后, 尚克刚等 (1993,1994) 建立了小鼠 ES 细胞^[273, 274], 刘红林等 (1998) 建立了小鼠孤雌 ES 细胞集落^[275]。

2.2 仓鼠 ES 细胞的研究进展

Piedrahita 等 (1990)建立了仓鼠的 ES 细胞系^[276]; Doetchman 等 (1998) 也建立了仓鼠的 ES 细胞系^[277], 但均未证实是否能够参与形成生殖系嵌合体。

2.3 牛 ES 细胞的研究进展

Saito 等 (1992) 利用 α -MEM, 添加 LIF 对牛 ICM 进行培养, 分离出牛类 ES 细胞, 传四代后消失, 认为传代后消失的原因是更换新的胎牛血清。该类 ES 细胞具有稳定的核型。实验观察到 ES 细胞能自发分化为上皮样细胞, 成纤维样细胞和神经样细胞^[278]。Sim 等 (1993) 利用低密度培养法, 使用 CR1 培养基添加 ITS (亚硒酸钠、胰岛素、转铁蛋白) 和

5% FCS 培养, 得到 15 个细胞株^[279]。自行分化可形成类胚体。用这些细胞进行核移植产生了 659 个核重组胚, 分裂率 70% (460/659), 109 枚发育至囊胚 (24%)。将 34 枚囊胚移入 27 个受体牛, 13 头牛妊娠, 最终产下 4 头正常犊牛。White 等 (1995) 从体外受精获得扩张囊胚, 链霉蛋白酶除去透明带, 从 10 个囊胚中分离得到 7 个类 ES 细胞株。该类 ES 细胞集落典型, 可形成简单类胚体, 体外培养 5 个月不分化^[280]。但碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, AKP) 染色呈阴性。Ito 等 (1996) 分析比较了牛体内和体外培养的桑椹胚卵裂球和囊胚 ICM 分离 ES 细胞的效果, 结果仅在囊胚组获得了 ES 细胞^[281]。Cibelli 等 (1997) 由 49 枚 7 日龄牛胚胎 ICM 分离得到 27 个类 ES 细胞克隆 (55%)。将 β -半乳糖苷酶基因导入 ES 细胞, 选择转染的 ES 细胞注入 8~16-细胞牛胚胎中, 其中 18 枚胚胎移植 7 头受体, 妊娠 5 周后, 得到 12 个胎儿。对胎儿进行检测, 6 个胎儿分别在生殖嵴或 PGCs 中检测到标记基因, 表明 ES 细胞参与了生殖系嵌合^[282]。Cibelli 等 (1998) 从体细胞核移植囊胚分离出牛类 ES 细胞, 注射法将 β -半乳糖苷酶基因导入 ES 细胞^[283]。将 8~10 个转基因 ES 细胞注入 8~16-细胞牛胚胎中形成嵌合体, 得到 99 个嵌合体胚胎, 22 个胚胎发育至囊胚。将 10 枚胚胎移入 5 头受体奶牛中产生了 6 头犊牛。Mitalipova 等 (2001) 用与前人不同的方法, 即从 2-细胞开始的胚胎卵裂球开始培养, 分离得到一株牛类 ES 细胞系, 传至 150 多代, 认为是第一例建立牛 ES 细胞系, 但得到的 ES 细胞传代后期核型不正常, 体内分化实验不能形成畸胎瘤, 而且未说明是否得到生殖系嵌合的嵌合体^[284]。

国内, 钱永胜等 (1996) 以 PMEF 为饲养层, 从牛的去透明带桑椹胚中分离得到类 ES 细胞, 并传 2 代^[285]。杨奇 (1999)^[286]、安立龙 (1999)^[287] 在原有实验基础上, 通过完善培养条件, 又将其分别传到 3 代和 6 代。

2.4 猪 ES 细胞的研究进展

Piedrahita 等^[277] 采用 STO、猪成纤维细胞和猪子宫上皮细胞作为饲养层, 以 DMEM 为培养基, 从猪囊胚 ICM 中分离得到猪 ES 细胞。Evans 等 (1990) 用与小鼠 ES 细胞分离培养相同的条件, 将 6~7 d 猪囊胚直接培养在 STO 饲养层上, 建立了猪类 ES 细胞系^[288]。Strojek 等 (1990) 认为猪 ES 原代培养使用猪子宫成纤维细胞较有利于 ICM 的附着与增殖^[289]。而继代培养时则使用 STO 饲养层较好。他还认为 10 d 囊胚最适合猪 ES 细胞的分离。Wheeler 等 (1994) 获得猪类 ES 细胞系, 并进行嵌合体实验, 毛皮嵌合体后代占 72%, 但尚未证明是否形成生殖系嵌合^[290]。ES 细胞可分化为上皮样细胞、肌肉细胞、脂肪细胞和成纤维细胞等。Miyoshi 等 (2000) 从体外受精囊胚中分离出 ES 细胞, 并以 ES 细胞为核供体获得核移植囊胚^[291]。

国内, 关于猪 ES 细胞分离培养的研究相对较少, 钱永胜等 (1996) 分离得到猪 ES 细胞传至 2 代^[285]。徐军等 (1997) 将猪 ES 细胞传至 3 代^[292], 冯秀亮等 (1999) 分离得到猪

ES 细胞传 5 代^[293]。董晓等 (2003) 也以 5~10 d 五指山猪胚胎为材料, 分离培养出猪 ES 细胞, 并传至 4 代^[294]。

2.5 羊 ES 细胞的研究进展

Handyside 等 (1987) 以绵羊皮肤成纤维细胞和胎儿成纤维细胞作饲养层, 从 7~8 d 绵羊囊胚分离 ES 细胞, 结果得到内胚层样细胞而无 ES 细胞出现^[295]。Tsuchiya 等 (1994) 用免疫外科法分离 8~9d 绵羊囊胚 ICM, 培养于 STO 细胞饲养层上, 得到 2 个 ES 细胞系, 传至 4 代^[296]。Bongso 等 (1994) 建立了山羊类 ES 细胞系^[297], Tillmann 等 (1996) 用胎牛肝成纤维细胞作饲养层分离得到传至 20 代的绵羊 ES 细胞和 40 代的山羊类 ES 细胞系^[298]。Campbell 等 (1996) 用第 1~3 代的 ES 细胞作核供体进行核移植, 得到 4 只绵羊^[299]。

2.6 兔 ES 细胞的研究进展

Graves (1993)^[300]和 Niemann 等(1994)^[301] 分别建立了兔的类 ES 细胞系。赖良学等 (1995) 成功地建立了兔的 ES 细胞系, 并获得皮毛嵌合体兔^[302]。童英等 (1997) 建立兔的类 ES 细胞系^[303]。

2.7 猴 ES 细胞的研究进展

在灵长类方面, 各国学者首先对猴进行研究。Thomson 等 (1995) 以小鼠胎儿成纤维细胞 (MEF) 为饲养层, 建立了恒河猴的胚胎干细胞系, 对该 ES 细胞增殖传代达一年多, 依然保持未分化状态, 核型正常(XY), 体内能形成三个组织胚层的畸胎瘤, 细胞表面抗原检测 (AKP, SSEA-3, SSEA-4) 呈阳性^[304]。Thomson 等 (1996) 建立了 8 个绒猴的 ES 细胞系, 其中 2 株在体外增殖 1 年多, 仍维持未分化状态^[305]。Cibelli 等 (2002) 利用恒河猴的卵母细胞孤雌激活后发育形成的囊胚建立了猴的胚胎干细胞系^[306]。

3 胚胎干细胞的建系方法

3.1 早期胚胎来源及适宜分离培养的时间

体内受精胚是从动物体内直接获取的新鲜胚胎, 一般质量很好, 是分离培养 ES 细胞最好的胚胎来源。体外受精所得胚胎、核移植所得的重构胚以及孤雌激活得到的囊胚也能作为 ES 细胞分离培养的原材料。考虑到所取胚胎在条件允许的情况下, 细胞尽可能的多以及在体外易于培养增殖, 并能保持多能性, 不同动物获取早期胚胎的时间不同。小鼠一般取 2.5~3.5d 桑椹胚或囊胚^{[[262]}; 猪取 9~10d 囊胚^[289]; 绵羊取 7~8d 囊胚或孵化胚^[296]; 山羊取 6~7d 囊胚^[298]; 牛取 7~8d 囊胚^[283]; 水貂取 6~7d 桑椹胚或囊胚^[307]; 人取 7~8d 囊胚^[257]。

3.2 胚胎干细胞分离培养方法

胚胎干细胞建系的原理是将早期胚胎 (囊胚或桑椹胚) 与抑制分化物共培养, 使之增殖并保持未分化状态, 随着传代数的增多, 细胞数量越来越多, 直到建立 ES 细胞系。胚胎干细胞的分离培养方法可分为全胚培养法、ICM 培养法、免疫外科法、机械剥离法和克隆法。

3.2.1 全胚培养法

全胚培养法就是将桑椹胚或囊胚直接培养在饲养层上, 让其自然脱去透明带, 贴壁, 与滋养层细胞一起增殖。当 ICM 增殖, 垂直向上生长, 一定时间后, 挑出 ICM, 并离散成小细胞团块, 进行继代培养, 克隆扩增。

3.2.2 ICM 培养法

ICM 培养法是指除去胚胎滋养层细胞, 直接对 ICM 进行培养与扩增的方法。根据分离 ICM 的方法不同可将其分为免疫外科法和机械剥离法。

免疫外科法是用链霉菌蛋白酶首先将胚胎的透明带除去, 裸胚在抗体中处理一段时间后, DMEM 清洗几次, 再在补体中作用一段时间, 由于补体反应, 滋养层细胞发生溶解, 得到纯的 ICM。以后方法与 ICM 培养法相同。此法是利用抗体、补体结合对细胞的毒性作用, 除去囊胚滋养层细胞, 而滋养层细胞能阻止抗体进入囊胚腔, 保护 ICM 不受损害。

机械剥离法就是采用机械方法除去胚胎滋养层细胞, 来分离培养 ICM 的一种方法。

3.2.3 克隆法

核移植 (克隆) 技术的迅速发展给胚胎干细胞研究带来了生机, 提供了一个新的途径。将成纤维细胞或转基因的成纤维细胞注入去核的哺乳动物卵母细胞中, 电融合或化学融合, 激活, 重组胚分裂至桑椹胚或囊胚。之后分离 ES 细胞方法基本与全胚培养法相同。

3.3 胚胎干细胞鉴定方法

3.3.1 形态学鉴定

ES 胞质小, 核大, 有一个或几个核仁, 细胞中多为常染色质, 胞质结构简单, 散布着大量核糖体和少量线粒体。ES 细胞在体外分化抑制培养的过程中, 呈克隆状生长, 集落隆起, 细胞界限不清, 边缘整齐, 折光性强。

3.3.2 免疫学鉴定

AKP 染色是检测 ES 细胞多能性的一种方法, ES 细胞保持着早期胚胎未分化的特性, 其表面含有丰富的 AKP 及胚胎阶段特异性抗原, 采用 AKP 染色或 SSEA 荧光染色, ES 细胞均表现为阳性反应。

3.3.3 核型分析

ES 细胞同其它体细胞一样，具有正常二倍体核型，无畸形、无缺失。若染色体异常，则其全能性和多能性受到影响。染色体异常的细胞很难发育成动物个体。因而，欲筛选可用于遗传操作的 ES 细胞，就必须对 ES 细胞进行核型分析。正常 ES 细胞系核型正常率应在 80%以上。

3.3.4 体内分化试验

体内分化试验就是把 ES 细胞集落离散后，按一定浓度（一般为 $10^6\sim 10^7$ 个/ml）注射到裸鼠（即免疫缺陷鼠）的皮下，观察有无组织瘤的出现。当瘤长到肉眼可见（一般直径为 1~2 cm）时，处死小鼠，取出组织瘤，做切片。如果是 ES 细胞，则组织瘤所做切片应包含代表三个胚层的细胞。

3.3.5 体外分化试验

ES 细胞的体外分化试验包括自发分化和定向诱导分化两个方面。自发分化是指把 ES 细胞集落离散后，接种到无饲养层也无分化抑制物的培养皿中，添加基础培养液，其中一部分聚集形成类胚体，进而有可能形成囊状胚体；而另一部分则有可能自然分化为成纤维细胞、神经细胞、心肌细胞等。有时在饲养层老化的条件下，ES 细胞集落也有向神经细胞、心肌细胞分化的趋势，这可能与饲养层细胞老化分泌的分化抑制因子大幅度降低有关。ES 细胞的定向诱导分化是将 ES 细胞悬浮培养，形成类胚体，然后，将类胚体贴壁培养，在基础培养液中添加相应的分化诱导因子，使 ES 细胞朝特定的方向分化。常见的分化诱导剂有视黄酸(retinoic acid, RA)、DMSO, 3-甲氧苄丙胺，神经生长因子及六亚甲基乙酰胺(HMBA)等。

3.3.6 嵌合体实验

能否参与胚胎发育并最终形成包括生殖系在内的嵌合体是衡量 ES 细胞多能性的一个重要指标。将 ES 细胞通过聚合法或注射法与受体胚胎相结合，在体外发育至一定阶段后移植到假孕母体内，产生嵌合体动物。嵌合体动物可以通过皮毛颜色、蛋白质、DNA 指纹、同工酶等进行检测。目前多种动物都已获得 ES 细胞参与形成的嵌合体，但真正能参与生殖系传递即能产生功能性配子的嵌合体仅在小鼠上得到证实。

3.4 胚胎干细胞的冻存及解冻

胚胎干细胞冷冻保存技术是胚胎干细胞的重要技术环节之一。一般冷冻液为 75% DMEM + 15% NCS (新生牛血清)+ 10% DMSO (二甲基亚砷)。冷冻程序为 4℃平衡 10 min，放入 -20℃冰箱作用 3~5h，-70℃冰箱过夜，第二天放入液氮中长期保存。也可在 -70℃冰箱中存放几个月。解冻一般在 37℃水浴中直到全部溶解，立即加入 ES 细胞培养液离心 2 次除去冷冻液，然后再放入 CO₂ 培养箱培养。

4 胚胎干细胞的应用前景

由于 ES 细胞具有上述特性,使胚胎干细胞技术在哺乳动物胚胎发育和基因组学研究等方面具有极大的应用价值。目前人类基因组计划已经完成,越来越多生物体的基因组已经或正在被测序,面对染色体上众多的新基因,获得这些基因的表达特性和生理功能是我们面临最艰巨的任务,ES 细胞研究在细胞和个体水平上架起了一道桥梁,在后基因组计划中,ES 细胞技术必将发挥非常重要的作用。

4.1 生产克隆动物

动物 ES 细胞具有多能性,并可以在体外增殖、冷冻,因而是克隆动物的理想材料。Wilmut 等 (1997) 研究表明,用体细胞克隆动物绝大部分死亡或有缺陷或畸形^[308]。用于克隆胚胎的体细胞,其基因表达模式在卵母细胞内必须进行再程序化 (reprogramming) 返回到全能的胚胎状态,才能指导胚胎的正常发育。无效的和错误的重新编程可能限制克隆动物的正常发育和长期存活,也可能与它们出现的异常表型有关。ES 细胞具有稳定的核型和多能性,要求较少的重新编程,此外,它比体细胞更耐受机械损伤。同种克隆实验已经证明 ES 细胞克隆胚胎的全程发育率高于体细胞克隆的胚胎^[271]。王鸿等 (2002) 发现小鼠 ES 细胞为核供体所构建的异种重构胚在体外发育到囊胚的比例明显高于小鼠胚胎成纤维细胞和成年小鼠外耳皮肤的成纤维细胞^[309]。ES 细胞为核供体比体细胞作为核供体所构建的异种重构胚更容易进行重新编程,并且 ES 细胞指导异种克隆胚胎正常发育的能力强于体细胞。

生产克隆动物主要有以下几个方面的意义:①大幅度提高良种家畜的繁殖效率。ES 细胞与胚胎嵌合或 ES 细胞核移植技术可使一头良种家畜在短期内生产较多的具有遗传同质型的动物。这不但可以充分发挥良种动物的生产潜力,而且可以加速动物良种化进程。②创造新物种。用异种动物细胞核移植和异种动物胚胎嵌合的方法可获得具有新性状的克隆动物或异种动物的嵌合体,这样有可能克服种间繁殖障碍,创造出新物种,获得用传统交配方法无法获得的新性状。③挽救濒危动物,保存稀有动物遗传资源。利用 ES 细胞克隆动物技术,一方面在短期内可以繁殖大量的濒危动物,迅速扩大濒危动物的群体数量;另一方面可以用冷冻的多能性细胞作供体进行细胞核移植克隆稀有动物。④为实验生物学提供新材料。利用细胞核移植技术可以同时克隆遗传背景完全相同的生物个体。这些生物个体可用于遗传参数的估测,饲料营养价值的评定以及环境与动物关系的研究等领域。

4.2 ES 细胞是基因修饰的高效载体

利用 ES 细胞生产转基因动物的方法有:①胚胎嵌合法。将一定数量的转基因 ES 细胞

注射入囊胚或将转基因 ES 细胞和裸胚共同培养, 生产转基因嵌合胚, 将转基因嵌合胚移植给同期发情的受体母畜, 使其妊娠, 生产携有外源基因的嵌合体动物; ②细胞核移植法。以转基因 ES 细胞作供体进行细胞核移植, 生产转基因胚胎, 将转基因胚胎移植给受体母畜, 生产转基因动物。

与传统育种方法相比较, 用 ES 细胞生产转基因动物的优势是: ①打破了物种的界限, 突破了亲缘关系的限制, 加快动物群体遗传变异程度。②可以进行定向变异和育种。利用同源重组技术对 ES 细胞进行遗传操作, 通过细胞核移植生产遗传修饰性动物, 有可能创造新的物种。③利用胚胎干细胞技术, 可在细胞水平上对胚胎进行早期选择。这样可以提高选择的准确性, 缩短育种时间。

利用 ES 细胞生产转基因动物, 具有重要的作用, 表现在: ①促进动物生长, 提高畜产品产量。目前, 已将大鼠、牛、绵羊及人的生长激素 (GH) 基因先后导入小鼠基因组, 得到的转基因小鼠在快速生长期 (5~11 周龄) 生长速度为对照组的 4 倍。转 bGH 基因猪的研究结果表明, 转基因猪日增重增加, 饲料转化率大幅度提高。②制作生物反应器。可以从转基因动物血浆和乳汁中获取药用蛋白质。从转基因动物血浆中提取重组蛋白质的优点是可以反复采血而不需要杀死动物, 缺点是采血量受到限制和一些具有生物活性的重组蛋白质分泌进血浆对动物健康有一定的影响。动物乳腺摄取、合成、分泌蛋白质的能力很强, 并且能对重组蛋白质进行加工 (包括 β -羟基化, 糖基化, γ -羟基化等), 同时, 能将重组蛋白质折叠成有功能的构象。转基因动物乳腺成为公认的生产重组蛋白的理想器官。③动物抗病育种。通过克隆特定病毒基因组中的某些编码片段, 对其进行一定修饰后转入家畜基因组, 如果转基因在宿主基因组中能够表达, 那么畜禽对该病毒的感染应具有一定的抵抗能力。

4.3 生产用于人类器官移植的动物器官

使人类 ES 细胞与猪等动物的胚胎嵌合, 通过人、猪嵌合体动物为人类提供可移植器官。这样, 可以克服异种动物器官移植所出现的免疫排斥反应。将人的基因导入猪等动物 ES 细胞, 生产基因修饰猪。利用转基因猪为人类提供器官移植的材料。在体外培养体系能不断扩增并定向诱导分化的 ES 细胞是细胞组织甚至器官移植供体的理想来源, 并有望为组织坏死性疾病、退行性疾病、自体免疫性疾病提供根治手段, 如心肌坏死、帕金森疾病、糖尿病、白血病、肝功能衰竭、Duchenne's 肌营养不良等疾病已在动物模型研究中取得成功。将干细胞作为基因载体回输体内后成为脑细胞, 可将难以通过血脑屏障而有治疗作用的药物或蛋白产物释放到中枢神经系统进行长期治疗。

人类 ES 细胞能启动表达不同分化细胞类型的特异性基因, 也能分化为密集轴突和树突的神经元, 节律性收缩的心肌细胞, 间质细胞和非色素表皮细胞。人类 ES 细胞分化早期也

能表达内胚层基因产物，有肝细胞核因子- β 、胰岛素、胰高血糖素和生长抑素。利用骨髓基质细胞等培养条件可使人类 ES 细胞在体外向造血细胞分化。人类 ES 细胞系 H1、H9、与经辐射小鼠骨髓基质细胞 (S17 细胞) 在含胎牛血清而无任何其它外加生长因子条件下，分化为多种血细胞类型，包括与卵黄囊结构相似的类囊结构和造血干细胞。当在 S17 细胞中分化的人类 ES 细胞经甲基纤维素克隆形成分析时发现多种血细胞，包括红细胞、巨噬细胞、粒细胞。人类 ES 细胞能分化为滋养层细胞，合成分泌 α -脂蛋白和 hCG，可用于人胚盘发育和功能的研究。

4.4 建立人类遗传病研究的动物模型

Piedrahita 等 (1998) 以 PJPB 和 PNMC109 为载体(含有抗新霉素 *G418* 基因和 *aPloE* 基因序列)，利用同源重组技术定位操作 ES 细胞的阿卞脂蛋白(apolipoprotein)E 基因，制备 *aPloE* 基因缺失型 ES 细胞，将这种 ES 细胞导入囊胚腔，形成了嵌合胚胎。雌雄突变小鼠交配，生产了携带有 *aPloE* 基因突变的小鼠。这种 *aPloE* 基因突变性小鼠为科学家研究阿卞脂蛋白缺乏症及其临床治疗方法提供了动物模型^[310]。

4.5 研究胚胎发育的基因调控

ES 细胞可以在体外培养条件下引起基因突变并可预先对突变进行筛选，然后通过嵌合体途径传递到生殖系，通过检测子代的性状分离而确定该突变基因正常状态对机体的调控作用。这一技术通常与诱捕载体技术相结合进行个体发育的遗传学分析。诱捕载体原理是构建一个报道基因 (reporter gene)，它的表达依赖细胞内源的顺式调控元件，把报道基因在细胞的某个内源基因附近插入。理论上，插入基因的表达，反映了该插入部分内源基因的正常表达。按照这种原理，在发育过程中起重要作用的基因，可以根据报道基因在胚胎发育过程中的表达型式 (pattern) 鉴定出来。诱捕载体可分为两种，基因诱捕载体 (gene trap vector) 和增强子诱捕载体 (enhancer trap vector)。二者都以 LacZ 基因为报道基因。两种载体都可用电穿孔的方法导入 ES 细胞，每次试验约需 1×10^7 个 ES 细胞。

利用 ES 细胞进行发育机制研究的报道较多。除基因诱捕外，利用 ES 细胞进行基因剔除 (gene knockout) 的研究也正在蓬勃兴起。对基因表达的整体人工干预不仅限于表达某种目的基因，也可以专一地去除某种目的基因。这种有目的地去除动物体内某种基因的技术就称为基因剔除或基因靶向 (gene targeting) 灭活，其基本原理是建立在同源重组技术上。这种基因靶向灭活技术可以在细胞水平上进行，也可以在整体水平上进行。它的基本方式是将灭活的基因放入 ES 细胞中，使这一灭活基因通过同源重组取代原有的目的基因，筛选到基因已定点灭活的细胞后，将细胞通过显微注入小鼠囊胚中。细胞在小鼠囊胚中参与胚胎发育，最终形成嵌合体小鼠。由于嵌合小鼠的一部分生殖细胞来源于 ES 细胞，所以通过

小鼠培育即可获得纯合子基因剔除小鼠。基因剔除技术对于制作疾病的动物模型具有非常重要的意义。目前已用此法建立的动物模型有： β -地中海贫血，阿默海茨病，动脉硬化症，高脂蛋白血症等。

总之，ES 细胞在培养的细胞和个体发育之间，在体细胞和生殖细胞之间架起了桥梁，它兼有胚胎和体细胞的特性，在发育生物学、遗传学、生物工程和家畜育种学等学科中有不可替代的价值。ES 细胞研究与基因工程和胚胎工程相结合，必将使畜牧业、医疗工业、临床医学发生重大的革命，为人类创造无限的财富。

第二章 山羊卵母细胞体外成熟培养

从体外受精技术的应用并获得世界首例试管兔以来,已有 40 多年的历史。胚胎工程技术在此期间,取得了巨大发展。哺乳动物卵母细胞体外成熟、受精、发育、冷冻保存等技术日趋完善,而且胚胎工程后技术如转基因动物及克隆动物的相继诞生预示其发展的巨大活力。随着科技的发展,胚胎工程的瓶颈日益显露,如不足的卵母细胞来源,低质量的卵母细胞,不完善的培养体系等都制约其发展。为了变废为宝,利用屠宰厂的卵巢,获得了大量的卵母细胞,特别是牛卵巢卵母细胞的采集和体外受精发展较为完善。牛卵母细胞的采集是使用注射器,抽吸 2~6 mm 卵泡,获得卵丘-卵母细胞复合体(cumulus-oocyte complex, COC),而且体外成熟率也很高,达到 90%以上^[311]。山羊卵母细胞的获得方法、成熟条件等很不完善,而且体外成熟影响因素太多。在山羊超数排卵所获的体内 90%卵母细胞达到成熟,通过体外受精可以得到高的受精率,移植后,也有后代出生^[31]。但是通过体外成熟,受精获得的后代较少。为此国内外许多学者比较了培养液容量、激素、卵母细胞来源、甚至包括维生素等对山羊卵母细胞的影响^[312]。这些结论都表明,能够经体外成熟、体外受精、和早期胚胎体外培养发育到囊胚的山羊胚胎比例不高^[30]。本研究就关于如何提高山羊卵母细胞的回收、成熟液调整对比、以及添加不同激素对山羊卵母细胞成熟发育的影响作了进一步探讨。

1 材料和方法

1.1 液体

1.1.1 操作液

DPBS (无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+}) +100IU/ml 青霉素 (华北制药) +100ug/ml (华北制药) +10% FCS (Gibco BRL)。DPBS (mg/100ml) 配方: NaCl, 800; KCL, 20.0; CaCl_2 , 10.0; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10.0; Na_2HPO_4 , 11.5; KH_2PO_4 , 20.0; 葡萄糖, 100.0。

1.1.2 成熟培养液

M199 (Gibco BRL) +10% FCS。成熟液配制 (100ml) : M199, 0.95g; NaHCO_3 , 0.22g; HEPES, 0.5958g; 庆大霉素, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。激素根据实验需要进行适当的调整,基础为 FSH 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, LH 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 17 β 雌二醇 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

1.2 山羊卵丘卵母-细胞复合体的收集与培养

屠宰场收集卵巢,采集的卵巢放入温度为 20~30℃ 含 0.3 mg/ml 硫酸庆大霉素的生理盐

水中，在 3h 内运抵实验室。用灭菌生理盐水洗卵巢 3 次，并剪去输卵管等附属组织，然后采用切割法收集卵母细胞复合体，也就是将准备好的卵巢置于平皿中，用刀片切割 1~6 mm 卵泡，使得卵母细胞随卵泡液进入 PBS 液中。完成后，在体视显微镜下收集卵丘-卵母细胞复合体 (COCs) 进行体外成熟培养。六孔培养板微滴培养，培养前 2h 制作微滴，上盖石蜡油在 CO₂ 培养箱预平衡。培养条件为：38.5℃，5% CO₂，饱和湿度，分别培养 24h、27h、30h。

1.3 COC 复合体的分级

采集到的 COCs，根据 Pawshe 等 (1994)^[28]、陈大元等 (2000)^[3]的分类方法分为 3 级：A 级为胞质均一致密，外围至少有 3 层以上卵丘细胞包裹，而且包裹致密；B 级为外围包裹细胞不足 3 层，或有的地方有缺口，但是形态正常；C 级主要是胞质不均一，外形不规则，或无卵丘细胞包裹，即裸卵（图 2-1）。



图 2 - 1 成熟培养前不同等级卵丘 - 卵母细胞复合体

Plate 2-1 Different grade cumulus-oocyte complexes of goat before in vitro culture

1.4 卵母细胞成熟的判定

成熟培养完成后，观察卵丘细胞的扩展程度：如果大部分扩展是原来大小的 5 倍以上，而且在灯光下，透亮，说明这批整体成熟效果较好。检查第一极体排出：将 COCs 置于含有 0.1% 的透明质酸酶 (Sigma) 的 DPBS (无 Ca²⁺、Mg²⁺)，漩涡振荡 3 min，去除卵丘细胞，

然后在显微镜下，观察第一极体排出情况。也可用胚胎吸管直接吹打 5~10 min，可去掉卵丘细胞。

1.5 受精处理及胚胎培养

受精处理及胚胎培养具体方法见第三章和第四章

1.6 数据处理

每一试验，都是在同一批次下分组进行，重复至少 3 次。 χ^2 检验分析。

2 结果

2.1 不同分级卵母细胞的成熟比较

按照卵丘包裹程度的分级原则，分 A、B 和 C 3 级。成熟后，去除卵丘细胞观察卵丘细胞扩展、第一极体排出，并统计成熟培养结束后卵母细胞成熟率。结果见图 2-2、图 2-3、图 2-4 及表 2-1。

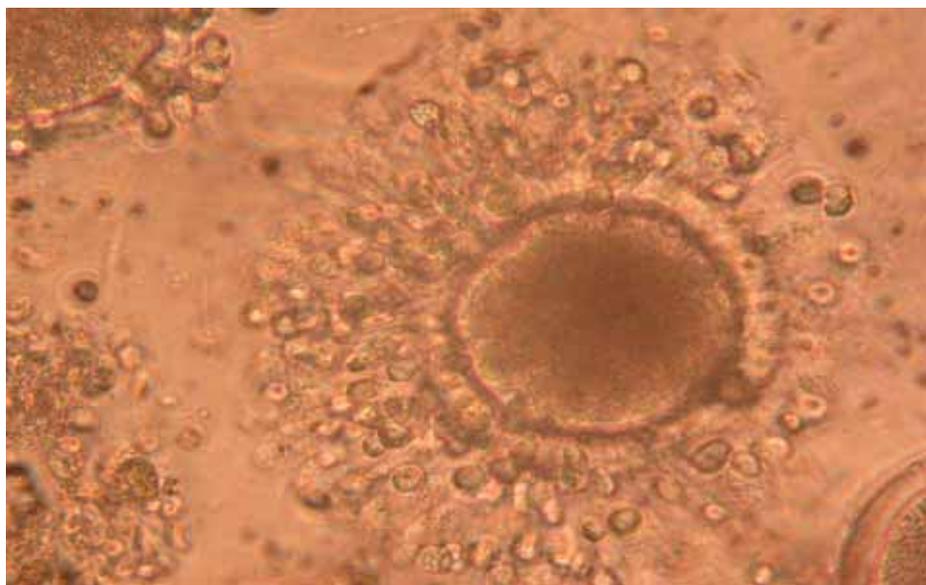


图 2 - 2 山羊卵母细胞成熟后卵丘细胞高度扩展

Plate 2-2 The cumulus cells highly dispersed after in vitro maturation of goat COCs

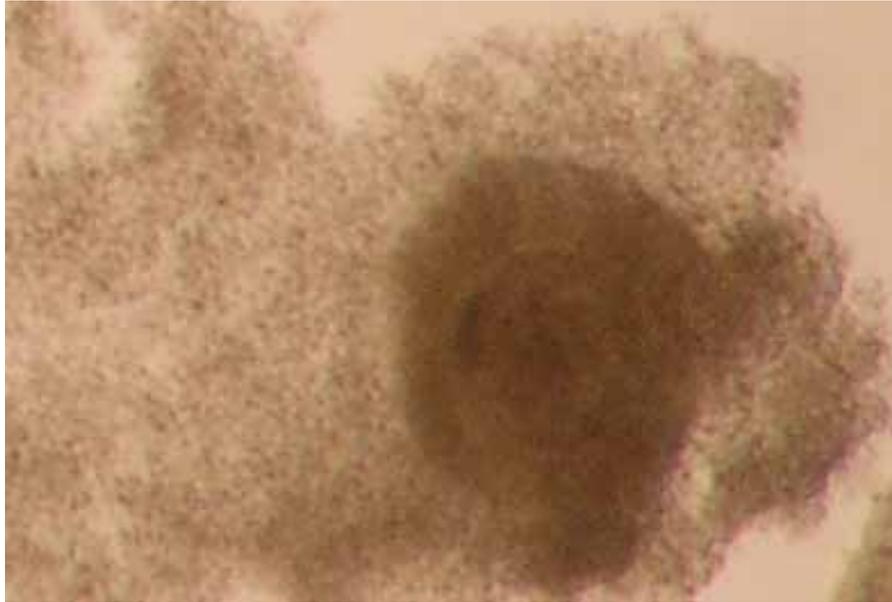


图 2 - 3 山羊卵母细胞成熟后卵丘细胞完全扩展

Plate 2-3 The cumulus cells completely dispersed after in vitro maturation of goat COCs

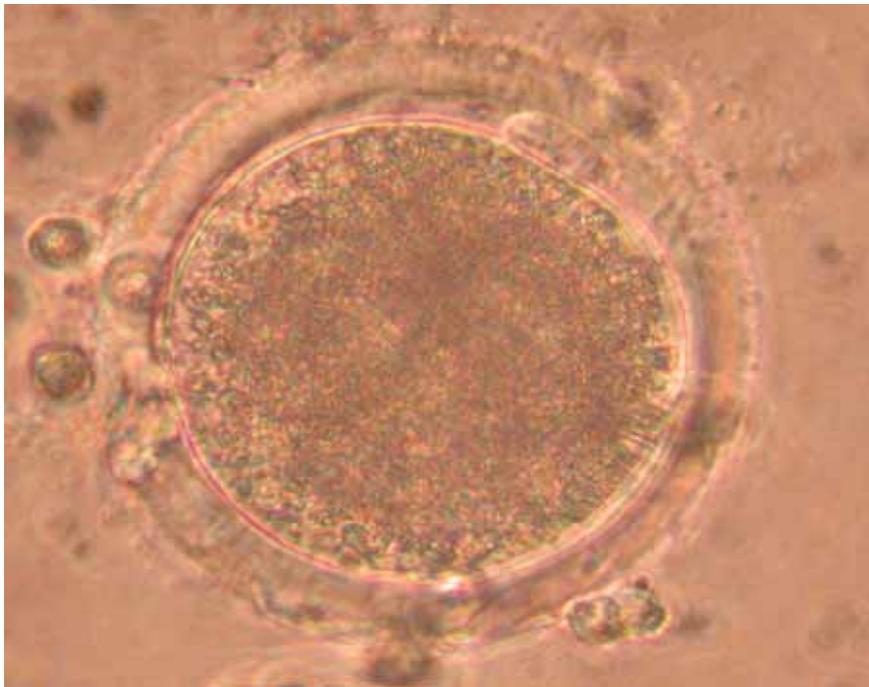


图 2 - 4 山羊卵母细胞成熟后排出第一极体

Plate 2-4 The first polar (PB_1) after in vitro maturation of goat oocyte

表 2 - 1 不同等级卵母细胞成熟比较

Table 2 - 1 The comparison of the maturation rate of goat oocytes with different grades

级 别	卵丘细胞层	卵母细胞	第一极体排放	成熟率 (%)
Grades	Layers of cumulus	Oocytes	PB ₁	Maturation rates (%)
A 级	完整包裹, 胞质均匀	245	176	71.8 ^a
B 级	有部分透明带裸露	150	65	43.3 ^b
C 级	裸卵	191	21	10.9 ^c

上标 a, b, c 为差异显著即 (P<0.05)

^{a, b, c}different superscripts within columns are significantly different (P<0.05)

表 2—1 表明, 不同级别的卵母细胞, 成熟培养后, 第一极体排出率差异极显著, 特别是 A 级成熟后, 成熟率达 71.8%, 显著高于 B 级 (43.3%) (P<0.05), 极显著高于 C 级 (P<0.01), 而且 A 级的卵丘细胞扩展充分; C 级成熟后, 变化不太显著, 成熟率仅为 10.9%; B 级介于二者之间。此外, 作者实验得出, 成熟的 C 级卵母细胞受精后, 没有一个发育到囊胚 (未列出)。因此, 以下试验, 全部采集 A 级卵母细胞进行成熟培养。

2.2 不同成熟时间对山羊卵母细胞成熟的影响

选取 A 级 COCs 进行成熟培养。24h、27h、30h 三个不同成熟时间, 成熟率分别为 63.3%、65.8%和 70.4%, 第一极体排出差异不显著 (P>0.05), 但有增高的趋势, 受精后, 30h 组卵裂率显著低于 27h 组 (P<0.05) 和 24h 组, 卵裂率分别为 42.05%, 61.0%和 48.7% (表 2—2)。

表 2 - 2 不同成熟时间对卵母细胞成熟的影响

Table 2—2 The effects of culture time on the maturation of goat oocytes

成熟时间 (h)	卵母细胞	成熟 (%)	卵裂 (%)
Maturation time (h)	Oocytes	Matured (%)	Cleaved/Matured (%)
24	120	76 (63.3 ^a)	37 (48.7 ^{ab})
27	117	77 (65.8 ^a)	47 (61.0 ^a)
30	98	69 (70.4 ^a)	29 (42.0 ^b)

上标 a, b 为差异显著即 (P<0.05)

^{a, b}different superscripts within columns are significantly different (P<0.05)

2.3 成熟液中添加不同浓度雌激素对山羊卵母细胞成熟的影响

表 2—3 用来说明成熟液中分别添加不同浓度的 E₂ 对卵母细胞成熟的影响。可见, 随

着雌激素浓度的升高，成熟率分别为 65.5%、65.8%、46.9%和 42.8%，第一极体排出率显著的下降，而空白组和 1 μg 组之间，成熟差异不显著。而 10 μg 组和 100 μg 组中，极体排出率显著降低。在成熟后，卵丘细胞的扩展程度受 E_2 浓度的影响，即扩展程度与 E_2 浓度成反比。这说明 E_2 浓度过高抑制第一极体的排出。

表 2 - 3 成熟液中添加不同浓度雌激素对山羊卵母细胞成熟的影响
Table 2—3 The effects of E_2 with different density on the maturation of goat oocytes

E_2 浓度 E_2 densities	卵母细胞 Oocytes	第一极体排出 PB_1	成熟率 Matured/Oocytes (%)	卵裂率 Cleaved/matured (%)
空白对照	90	59	65.5 ^a	24(40.6 ^b)
1 μg	120	79	65.8 ^a	46(58.2 ^a)
10 μg	113	53	46.9 ^b	15(28.3 ^b)
100 μg	112	48	42.8 ^b	5(10.4 ^c)

上标 a, b, c 为差异显著即 ($P < 0.05$)

^{a, b, c} different superscripts within columns are significantly different ($P < 0.05$)

2.4 HT 和 β - ME 对卵母细胞成熟的影响

为了消除试验误差，本研究使用聚乙烯醇 (polyvinyl alcohol, PVA) 代替胎牛血清 (FCS)，测定添加亚牛黄酸 (hypotaurine, HT) 和 β -巯基乙醇 (β -mercaptoethanol, β -ME) 对山羊卵母细胞成熟的影响。在成熟液分别添加 HT、 β -ME 对照组，成熟率分别为 37.0%、55.3%和 34.1%。 β -ME 对卵母细胞成熟有促进作用，显著提高了卵母细胞的成熟率。第一极体排出率达到 55.3%，HT 对卵母细胞成熟作用甚微。同样，谷胱甘肽成部分 (glutathione, GSH) 含量也是 β -ME 组最高，显著高于其它两组 (表 2—4)。

表 2 - 4 HT 和 β - ME 对山羊卵母细胞成熟的影响(重复四次)
Table 2 - 4 The effects of oocytes of HT and β - ME on the maturation(with four replications)

蛋白来源 Protein Sources	添加物 Supplements	卵母细胞数 Numbers of Oocytes	GSH 含量 GSH Content (nmol/10 μl)	第一极体 (%) $\text{PB}_1/\text{Oocytes}$ (%)
0.1%PVA	无	88	0.73 ^b	30 (34.1 ^b)
0.1%PVA	HT (10 mM)	84	0.81 ^b	32 (37.0 ^b)
0.1%PVA	β -ME (5 μM)	103	1.04 ^a	57 (55.3 ^a)

上标 a, b 为差异显著即 ($P < 0.05$)

^{a, b} different superscripts within columns are significantly different ($P < 0.05$)

2.5 不同成熟激素对山羊卵母细胞成熟的影响

本试验对比在成熟液中添加不同来源激素对山羊卵母细胞体外成熟是否产生影响（表 2-5）。进口 FSH+LH 的成熟效果与国产绒促激素（促卵泡素和促黄体素）对山羊卵母细胞成熟均有促进作用，卵母细胞成熟率都极显著高于空白对照组，但是它们之间的成熟率差异不显著，分别为 67.3%和 68.9%。

表 2 - 5 不同激素对卵母细胞成熟的影响
Table 2 - 5 The effects of Gonadotrophins on the maturation of oocytes

激素 Gonadotrophins	卵母细胞 Oocytes	成熟卵母细胞 Matured Oocytes	成熟率（%） Maturation rates（%）
FSH+LH （进口）	245	165	67.3 ^a
促绒激素 （国产）	312	215	68.9 ^a
空白对照组	134	21	15.6 ^b

上标 a, b 为差异显著即 (P<0.01)

^{a, b} different superscripts within columns are significantly different (P<0.01)

3 讨论

3.1 不同分级卵母细胞的成熟分析

卵母细胞内在质量，对发育潜力有决定性作用，而卵丘细胞的包裹程度，在一定程度上反应卵母细胞的质量。颗粒细胞不仅保护卵母细胞，减少外界环境对其造成的应激，也为卵母细胞成熟发育提供所必须的营养因子，促进其核成熟和胞质成熟。此外还能减少透明带硬化，从而有利于精子获能入卵，提高卵裂率。卵丘细胞通过两种途径作用于卵母细胞：一方面是为卵母细胞提供生长和发育必需的营养物质，如丙酮酸、氨基酸、磷脂前体等；另一方面，通过间隙连接，传递卵母细胞成熟信息，进而促进卵母细胞的成熟^[313]。因此，卵母细胞的成熟与卵丘细胞的作用密不可分。Yu 等 (2003) 得出 FSH 对卵母细胞的作用是通过卵丘细胞来实现的，它促进卵丘细胞扩展，并且分泌营养因子，特别是 IGF-I，还有类固醇激素等，为卵母细胞的成熟创造条件^[314]。Byskov 等 (1997) 在研究小鼠卵母细胞成熟过程中发现，卵丘细胞能够分泌减数分裂激活物（meiotic activated steroid, MAS），诱导卵母细胞核由休止期进入成熟分裂期^[152]。此外，卵丘细胞在 FSH 和卵母细胞之间起协调作用。如在牛卵母细胞内没有 FSH 受体，而在卵丘细胞上却存在 FSH 受体。如果将牛

卵母细胞上卵丘细胞完全去除，其成熟率、受精率及胚胎发育率就会显著降低。卵丘细胞能诱发精子发生顶体反应，并增加其穿卵能力。受精时，卵丘细胞必须保持与卵母细胞的紧密结合。Hawk 等 (1993) 研究证明，卵丘细胞过多过致密也会阻碍精子入卵^[157]。这表明一定数量卵丘细胞的存在，是卵母细胞完成体外成熟及受精的必要条件。研究表明，卵丘细胞同样对山羊卵母细胞成熟有重要作用，A 级卵母细胞成熟率 (71.8%) 就极显著地高于 B、C 级 (分别为 43.3%、10.9%)。当卵母细胞成熟后完全去除卵丘细胞时，即使卵母细胞有第一极体排出，它的受精能力和发育能力极低，没有一个发育到囊胚。此外，即使在输卵管壶腹部受精，成熟卵母细胞外围仍带有部分卵丘细胞^[4]。体外受精时，卵母细胞外围保留部分卵丘细胞，也增加了小鼠、仓鼠、猪、牦牛等动物的正常受精率。因为颗粒细胞有诱导精子趋向运动，维持精子活力，促使精子获能和阻止透明带硬化等功能^[3]。因此，卵丘细胞对卵母细胞的成熟、受精都起着重要的作用。必须严格筛选 COCs，选取 A 级卵母细胞进行成熟培养，B、C 级弃掉不用。

3.2 不同成熟时间对山羊卵母细胞成熟的影响

不同物种卵母细胞体外成熟时间不同，如牛需要 24h 成熟就足够了，而猪则需要 42~48h。卵母细胞体外成熟时间对卵母细胞的成熟、受精是很重要的。因为排卵后，如果没有受精，卵母细胞很快老化。在体外更是如此，培养时间短，不易成熟，培养时间长，又容易发生透明带硬化，从而造成不受精现象。Rho 等 (2001) 表明，20h、24h、27h 组中，27h 组山羊卵母细胞的成熟率 (73%) 显著高于其它两组 (30%和 55%)^[175]。本研究设计为 24h、27h、30h 三组，结果表明，不同成熟时间对第一极体排出的影响差异不显著，有增高的趋势，成熟率分别为 63.3%、65.8%、70.4%。但受精后，发现 30h 组受精后卵裂率要显著低于 27h 组，分别为 29%和 47%。24h 组介于其中，卵裂率为 48.7%。这也许是成熟时间过长，导致了透明带硬化变性，不利于精子入卵。但是就囊胚的质量来看，还是 30h 组高于对照组，这可能是由于时间长，有利于胞质充分成熟。同时说明卵母细胞胞质成熟与受精是一对矛盾。而成熟 24h 组，不论是胞质成熟还是核成熟都不完全。进一步通过固定染色，同样得出山羊卵母细胞成熟 27h 要显著优于 24h 组。所以，山羊卵母细胞应该以成熟 27h 为宜。

3.3 成熟液中添加不同浓度雌激素对山羊卵母细胞成熟的影响

有关类固醇激素在卵母细胞成熟中的作用有许多报道，但是对于不同物种，得出的结论不一致。如雌激素对仓鼠和猪卵母细胞核成熟有抑制效应，雌激素的添加可能会导致形成异常纺锤体比率的增加；对于胞质成熟，有利于牛、兔等动物卵母细胞胞质成熟，对猪卵母细胞胞质成熟抑制。Schams 等 (2003) 研究表明类固醇对卵母细胞的发育，以及卵丘细胞的扩展有重要作用^[315]。在许多物种的卵母细胞内有 E₂ 受体，说明 E₂ 可以直接与卵母

细胞结合，通过钙离子系统调节卵母细胞胞质成熟。但是 Huynh 等 (2003) 通过基因敲除小鼠发现，雌激素并不是直接作用于卵母细胞，而是对卵泡生长和排卵有反馈调节作用^[75]。在牛、人、小鼠，猪等多种动物的卵丘细胞，颗粒细胞也合成雌激素，如 Mingoti 等 (2002)^[316]、Behl 等 (2002) 报道成熟液中添加 FSH，能够显著地诱导卵丘细胞分泌 E₂^[317]。而 E₂ 对山羊卵母细胞成熟是否有促进作用，报道很少。旭日干 (1989) 认为，在培养液添加 HCG 时，雌激素对牛卵母细胞的体外成熟和发育不十分重要^[318]。Margot 等 (2002) 报道，猪卵母细胞成熟液添加不同浓度的类固醇激素，对其成熟无显著影响，通过放射免疫测定，发现卵丘-卵母细胞复合体自身分泌一定浓度的 E₂，足够用来供给卵母细胞进行核成熟和胞质成熟^[132]。刘灵等报道，成熟液中添加 E₂，可以使山羊卵母细胞成熟率从 56.7% 提高到 80.2%，从而显著提高山羊卵母细胞的体外成熟率^[319]。本研究表明添加 1 μg/ml E₂ 与对照组差异不显著，成熟率分别为 65.8%、65.5%，但显著高于 10 μg/ml 组和 100 μg/ml 组，成熟率分别为 65.8%、46.9%、42.8%。说明添加 1 μg/ml E₂ 并不会对山羊卵母细胞成熟产生影响。但对于受精后的卵裂率，添加 1 μg/ml E₂ 组 (58.2%) 显著高于对照组 (40.6%) 和 10 μg/ml 组 (46.9%)，极显著地高于添加 100 μg/ml E₂ 组 (10.4%)。说明当 E₂ 浓度为 10 μg/ml 以上时，对山羊卵母细胞的核成熟，有强烈的抑制作用。Kruip 等 (1998) 也得出只要 E₂ 超过 5 μg/ml，就会对牛卵母细胞纺锤体形成和第一极体排出有副作用^[320]。赵伟等 (1998) 认为添加 1 μg/ml E₂ 与 LH 峰后排卵前卵泡液中 E₂ 浓度大致相同^[321]。江金益等 (1990) 在水牛上也得出同样的结论，认为加入 1 μg/ml E₂，成熟卵数明显增加^[322]。因此，对于山羊卵母细胞的成熟，添加 1 μg/ml E₂ 有利于胞质成熟，从而提高受精后胚胎发育能力。但 E₂ 的添加具有剂量依赖性，剂量过高，就会严重的抑制卵母细胞核成熟（见表 2-3）。

3.4 HT 和 β - ME 对卵母细胞成熟的影响

卵母细胞成熟的质量，特别是胞质成熟，对胚胎后期发育至关重要。在体外成熟培养中，由于环境中的氧气浓度显著高于子宫内环境，常常在培养液中添加抗氧化剂，清除氧自由基，保护细胞膜脂质不被氧化。如亚牛黄酸、半胱氨酸、β-巯基乙醇等常被添加于卵母细胞成熟和体外胚胎发育的培养液中，能增加牛卵母细胞和体外胚胎 GSH 水平，保护细胞，减少过氧化侵害^[256, 323]。谷胱甘肽、β-巯基乙醇等抗氧化物质不仅可以清除卵母细胞内的氧自由基，同时还可以在细胞分裂时作为二硫键断裂的供氢体^[250, 252]。成熟液中加入 GSH 增加山羊卵母细胞内 GSH 的浓度，但没有明显提高卵母细胞的受精率，因为体细胞和卵母细胞都不能直接将 GSH 转移进细胞内，细胞内的 GSH 是由其他物质合成的，如 β-巯基乙醇、半胱胺等都是用于合成 GSH 的。卵母细胞体内成熟包括核成熟和胞质成熟，通过观察卵母细胞核减数分裂来判定核成熟，而测定胞质中 GSH 水平可以判定胞质成熟。如在猪^[324]和牛^[325]卵母细胞成熟后，GSH 浓度升高是卵母细胞成熟的重要标志。Mizusshima

等 (2001) 在牛卵母细胞成熟液中添加 β -ME, 提高了后期胚胎的发育, 结果表明胞质内 GSH 浓度增加^[240]。

在卵母细胞成熟液中, 一般要添加胎牛血清 (FCS)^[326]或者牛血清白蛋白 (BSA)^[327], 它们包含多种生长因子和激素, 使成熟体系在可重复性和质量控制上带来不便。因此, 本研究使用 PVA 替代 FCS, 从而在限定培养液中, 确定添加物质对山羊卵母细胞的影响。在限定性成熟液中添加抗氧化剂 HT 和 β -ME, 探讨其对山羊卵母细胞体外成熟的影响。结果表明添加 5 μ M β -ME 能显著提高山羊卵母细胞的成熟率 (57%), 也提高了胞质内 GSH (1.04 nmol/ul) 的水平。但是在成熟液中添加 HT, 虽然也增加了卵母细胞内的 GSH 含量 (HT 组 GSH 为 0.81 nmol/ul, 对照组为 0.73 nmol/ul), 但成熟作用不显著 (HT 组成熟率为 32%, 对照组为 30%)。这一结果与 Lim 等^[328]结论一致, 他们认为成熟液添加 HT 对卵母细胞体外成熟并没有促进作用。所以, 建议山羊卵母细胞成熟液中添加 β -ME, 能促进卵母细胞成熟。

3.5 不同成熟激素对山羊卵母细胞发育的影响

FSH、LH 是卵母细胞体外成熟培养液中使用较多的促性腺激素。FSH 诱导卵丘细胞扩展是卵母细胞成熟的前提条件, 刺激卵丘细胞产生一种促卵母细胞成熟的因子^[183]。研究表明, FSH 通过升高颗粒细胞内 cAMP 水平使卵母细胞成熟受到抑制, 从而达到胞质的充分成熟。FSH 还可使卵丘细胞扩散^[131]。而 LH 峰的出现克服了卵母细胞成熟抑制因子的作用^[65]。使经卵丘细胞运输到卵母细胞并抑制卵母细胞成熟的物质如 cAMP 减少, 导致卵母细胞成熟。在山羊卵母细胞体外成熟中, FSH 和 LH 联合应用能显著提高成熟率和受精后胚胎的发育率。FSH 和 LH 联合使用时, 成熟率显著高于对照组^[327]。卵母细胞的成熟, 受一系列的激素调控, 包括 FSH、LH、E₂ 等, 在其发育成熟过程中起重要作用。本研究比较了两种不同激素组合类型对卵母细胞成熟的影响。结果表明, 使用“FSH+LH”(进口)与国产绒促激素, 对山羊卵母细胞成熟的影响差异不显著, 成熟率分别为 67.3%、68.9%。和对照组相比, 都显著提高卵母细胞体外成熟率 (对照组为 15.6%)。所以, 添加国产绒促激素和进口的“FSH+LH”, 成熟效果一样。但国产激素成本低, 使用方便。所以在卵母细胞体外成熟培养时, 完全可以用国产的绒促激素配合代替进口的 FSH 和 LH。

4 结论

在山羊卵母细胞体外成熟培养中, 选用胞质均一致密, 外围至少有 3 层以上卵丘细胞包裹, 而且包裹致密的 A 级卵母细胞, 添加浓度为 1 μ g/ml 的 E₂、5 μ M 的 β -ME, 成熟培养 27h 可以显著提高卵母细胞体外培养的成熟率。促成熟激素使用国产绒促激素完全可以代替进口的 FSH 和 LH, 在相同效果的前提下大大降低成本。

第三章 山羊卵母细胞体外受精方法的研究

哺乳动物体外受精技术从 20 世纪 50 年代初到现在已得到深入而系统的发展，但对山羊体外受精的研究则进行得较迟。直到 1985 年日本学者 Hanada 用超排山羊卵母细胞与精子体外受精后移回受体羊输卵管中，培育出世界上第一只试管山羊^[176]。钱菊芬等 (1991) 以相同方法培育出我国首例“试管山羊”^[177]。Younis 等 (1991)首次报道了由体外成熟山羊卵母细胞经体外受精而使受体羊怀孕的实例^[178]；虽然有试管山羊诞生，但是成功率很低，而且都是通过对供体山羊进行超排处理后冲取成熟卵母细胞或活体采卵后体外受精。经过卵母细胞体外成熟所获的山羊胚胎数量非常有限，其主要原因是体外受精后，精子头部未能去浓缩，不能够顺利形成原核，致使卵裂失败。这与卵母细胞体外成熟的质量有关，因为胞质中调控精子去浓缩的物质浓度低；另一方面，精子的获能条件也影响了雄原核的形成。本研究的目的是以屠宰场废弃卵巢为实验材料，主要是优化山羊体外受精条件，提高体外成熟卵母细胞的受精质量和数量。

1 实验材料与方法

1.1 卵母细胞采集和成熟

卵母细胞采集和成熟方法同第二章

1.2 体外受精

1.2.1 受精液

使用 BO 液^[463]+50 IU/ml 庆大霉素+6 mg/ml BSA (Sigma 公司)。获能物质根据试验设计添加。

1.2.2 精子的准备

山羊冷冻精液购于冻精站，每次试验取两支。分离精子方法选用 Percoll 密度梯度离心法和上浮法两种。

Percoll 法是分别制备 90% 和 45% 的 Percoll 平衡盐溶液(获能液作稀释液)，将 2.0 ml 的 90%的 Percoll 置于 10 ml 试管底部，上部添加 2.0 ml 的 45% Percoll 溶液，将解冻后的精液置于最上层，室温下离心 15 min，去掉上悬液，然后收集底部沉淀，用获能液 6 min/次洗涤 3 次，然后待用。

上浮法是将精液轻轻置于含有 4 ml 获能液的试管底部，45° 倾斜置于培养箱内，39℃，5% CO₂，饱和湿度上浮 1h，然后取上清液，离心 6 min，处理 3 次，待用。

1.2.3 精子获能

将收集到的活精子置于获能液中，38.5℃，5% CO₂，饱和湿度下，孵育 1~2h。

1.2.4 体外受精

将预先制备好的受精液制成 100 μl 的受精微滴，上覆石蜡油。选取颗粒细胞扩展的卵母细胞，用吸管吹打，打掉部分颗粒细胞，然后将卵母细胞和精子在 100 μl 的受精微滴共孵育 24h，然后取出卵母细胞，进一步体外培养。精子终浓度为 5×10⁶ 个/ml。

1.2.5 受精率的观察

将卵母细胞外围的颗粒细胞吹打尽，并且在 25% 的乙酸乙醇中固定 48h，然后用 1% 的地衣红染色，在显微镜下观察精子入卵和雄原核的形成。

1.2.6 胚胎培养

受精后的卵母细胞使用 PBS 液冲洗 3 次，将外围的颗粒细胞和死精子去掉（特别是死精子），然后分组培养，培养液前 48h 使用 SOF+BSA，然后换液成 SOF+10% FCS，采用颗粒细胞共培养。

1.2.7 胚胎细胞计数

囊胚期胚胎用 Hoescht33342 (Sigma 公司) 染液染色 30 min，其浓度为 0.1 mg/ml，将经染色的胚胎置于 SOF (输卵管培养液)，在倒置显微镜下，200× 荧光计数。

1.2.8 数据处理

采用卡方检验进行统计学数据处理。

2 结果

2.1 肝素、咖啡因和钙离子载体对受精和胚胎发育的影响

受精观察见图 3-1 和图 3-2。受精液和获能液中，添加肝素 (Heparin)、咖啡因 (Caffeine)、和钙离子载体 (IA23187)，比较其获能效果。通过对比，发现肝素和钙离子载体组受精率分别为 56.0% 和 67.0%，显著高于咖啡因组 21.0% (P<0.05)。卵裂率反而是肝素高于钙离子载体和咖啡因组，分别为 51.1%、36.3% 和 19.0%，差异显著 (P<0.05)；发育到囊胚后，分别为 17.8%、11.7% 和 0，差异不显著 (表 3-1)。

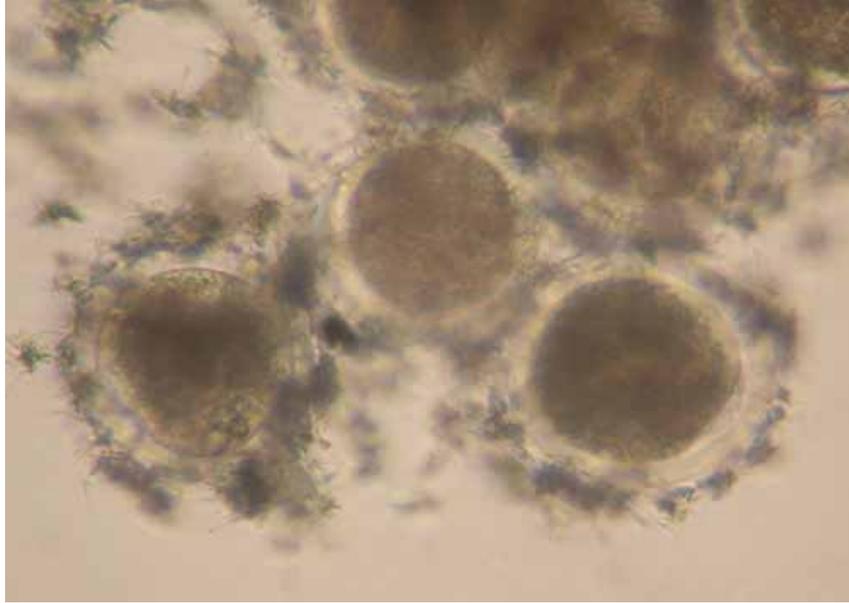


图 3 - 1 精卵共孵

Plate 3 - 1 The sperms and oocytes co-culture

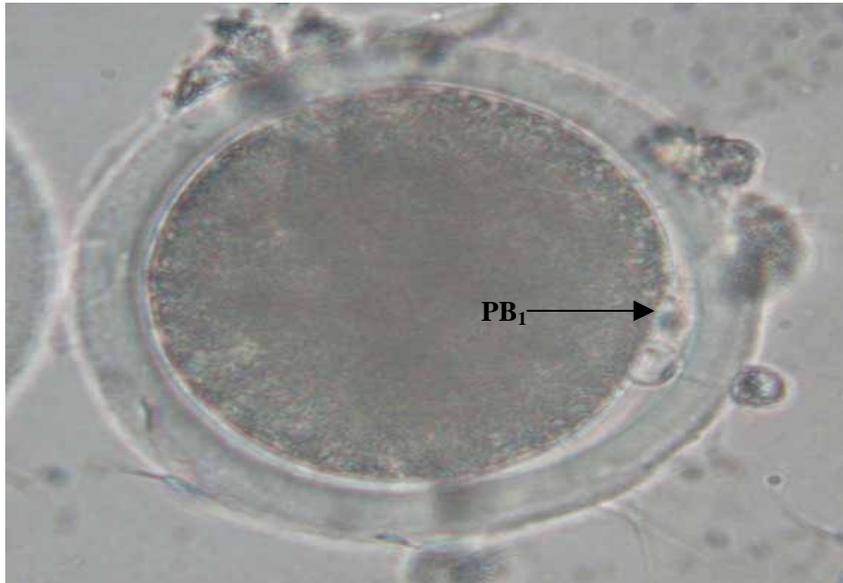


图 3 - 2 受精后排出第二极体

Plate 3 - 2 The PB₂ after fertilization



图 3 - 3 体外受精囊胚

Plate 3 - 3 The blastocyst of IVF

表 3 - 1 肝素、咖啡因和钙离子载体 IA 对受精和胚胎发育的影响

Table 3 - 1 The effects of Heparin、Caffeine and Ca²⁺ vector IA on the fertilization and embryonic development

获能液 BO Medium (ml)	受精率 (%) Fertilized (%)	卵裂率 (%) Cleaved (%)	囊胚率 (%) Blastocyst (%)
肝素 Heparin (50 μg)	56.0 ^a (62/112)	51.1 ^a (32/62)	17.8 ^a (11/62)
咖啡因 Caffeine(10 mM)	21.0 ^b (20/95)	19.0 ^c (4/20)	0(0/20)
钙离子载体 IA (0.1 μM)	67.0 ^a (73/109)	36.3 ^b (26/73)	11.7 ^a (8/73)

上标 a, b, c 为差异显著即 (P<0.05)

^{a, b, c}different superscripts within columns are significantly different (P<0.05)

2.2 精子的不同处理方法对卵裂率和囊胚率的影响

山羊精子的冷冻效果与耐受性要差于牛精子，而且精子活力在很短时间显著下降，所以选冻精时，严格检查活力。本试验在受精前，摸索高效筛选精子的方法。分别使用 Percoll 法和上浮法。结果表明，Percoll 法处理精子卵裂率为 59.1%，高于上浮法（42.9%），差异显著（P<0.05）；但是囊胚的发育率分别为 11.8%和 7.8%，囊胚的平均细胞数分别为 116 和

113, 两者差异不显著 (表 3-2)。

表 3 - 2 精子的不同处理方法对卵裂率和囊胚率的影响

Table 3 - 2 The effects of the different treatments to sperms on the percentage of cleavage

处理方法 Treatments	受精卵 Zygotes	卵裂率 Cleaved (%)	囊胚数 Blastocysts (%)	囊胚细胞数 Blastocyst cells
Percoll 法	93	55 (59.1) ^a	11(11.8) ^a	116 ^a
上浮法(Swim-up)	114	49 (42.9) ^b	9(7.8) ^a	113 ^a

上标 a, b 为差异显著即 (P<0.05)

^{a, b}different superscripts within columns are significantly different (P<0.05)

3 讨论

3.1 肝素、咖啡因和钙离子载体对山羊精子获能、受精和胚胎发育的影响

精子获能是正常生理受精过程的必须环节。只有获能后, 才能发生精卵结合, 穿过透明带和卵黄膜, 形成合子。精子在母畜生殖道, 活力和获能受其所处环境, 即输卵管液和子宫液调节。其中生物活性物质主要是 cAMP 和 GAG (氨基多糖), 以及平衡的离子浓度, 对精子的获能至关重要^[328]。而在体外获能, 多采用获能诱导剂如肝素、咖啡因、IA (钙离子载体) 等。IA23187 可与钙离子形成复合物, 携带钙离子进入精子, 使 Ca^{2+} 内流, 从而诱发顶体反应, 激活顶体酶系。咖啡因加强钙离子载体的作用, 提高线粒体的代谢和精子活力。肝素可去除精子表面精浆成分, 在牛等动物精子获能中, 已经取得很大成功。但是, 在山羊精子获能中, 目前的技术方法还不十分成熟。Keskinetepe 等 (1994) 观察山羊卵母细胞受精后的卵裂球染色体倍数, 发现有单倍染色的占 59%^[329]。精子受精后去致密化失败也是山羊体外受精胚胎发育低下的原因。

研究不同获能处理对山羊精子获能效果的影响, 旭日干等 (1990) 首次使用 IA, 获得试管山羊, 且得出处理精子时的最佳浓度为 0.5 μ M, 处理 2 min^[34]。但刘红林等在使用肝素与钙离子载体对猪精子获能处理时, 二者差异不显著, 只是肝素要省时简便, 这可能是物种不同。LH 等 (1988) 研究表明, 用肝素处理牛精子 15~30 min 有助于精子穿透卵母细胞^[330]。羔山羊卵母细胞体外受精时, 0.5 μ M/ml IA 处理, 受精率显著高于肝素组, 但是发育到 2~4-细胞的胚胎数少于对照组^[331]。在牛上, 肝素与 IA 联合使用效果也不显著^[332]。本研究结果表明, IA 能提高受精率, 但是显著降低卵裂率, 受精率、卵裂率分别为 67.0%、36.3%, 这可能是由于试验方法的差异造成的。而单独添加咖啡因, 并没有促进获能, 也降低了胚胎发育率, 其受精率、卵裂率分别为 21.0%、19.0%。在牛精子获能中, 单独使用 IA, 牛精子很易死亡, 当加亚牛黄酸或肾上腺素时, 精子耐受性增加。咖啡因只能增加精子活

力，不能诱导精子获能，且咖啡因对雄原核的形成有副作用。Izquierdo 等 (1998) 研究表明，咖啡因不能促进受精^[333]。而且使用咖啡因处理牦牛精子，虽然对精子的获能及受精有促进作用，但是受精后，卵裂率降低，这是因为咖啡因对精子的染色体有损伤。本研究表明，精子在获能过程中，IA 的获能效率高，但是受精后，卵裂率和囊胚率降低，咖啡因组的受精率和卵裂率都显著低于其它两组，分别为 21.0%、19.0%。只有肝素效果比较稳定，受精率、卵裂率分别为 56.0%、51.1%。但是这三组的总体受精率、发育率还很低，所以在山羊精子获能中，还需要大量的试验研究。

3.2 精子的不同处理方法对卵裂率和囊胚率的影响

本试验中使用的 Percoll 是 SiO₂ 外被 PVP 包裹的胶体悬浮物。在梯度离心过程中，精子的分布与所受的离心相平衡，活力好的精子更容易聚集在离心管的底部^[334]。

体外受精过程中，精子的分离方法有上浮法、梯度离心法（牛体外受精中多见）和 percoll 法等。但羊的精子分离通常用上浮法。Palomo 等 (1999) 通过对比，上浮法得到的精子活力和顶体完整率都好于其它方法，但卵母细胞的受精率和卵裂率没有显著差异^[335]。但是 Rho 等^[175]得出用 Percoll 法分离的精子效率是上浮法的 4 倍，并且提高精子活力，受精后，原核形成要早，大多发生在受精后 6h。Parrish 等 (1995) 在分离牛精子中得出，梯度离心法的效率高出上浮法的 5 倍^[336]。在人类精子分离中，不允许使用 Percoll，因为其包被的 PVP 对精浆、顶体以及人精子的线粒体膜都有副作用。Rho 等 (2001) 认为 percoll 法分离山羊精子受精后，囊胚细胞数显著增加，促进精子的顶体反应，缩短受精时间^[175]。但是本研究未发现囊胚细胞数增加。通过对比，Percoll 法处理精子卵裂率要显著高于上浮法，分别为 59.1%、42.9% (P<0.05)，但是囊胚率和囊胚细胞数差异不显著，分别为 11.8%、7.8%。可能的解释是 Percoll 法只对山羊精子的活力有促进作用，而使得部分精子过早释放顶体内酶类，从而影响受精。此外，上浮法的精子镜检活力要好于 Percoll 法分离的精子。对此还需要进一步研究证明。

4 结论

对肝素、咖啡因、钙离子载体 IA 三种获能物比较，肝素效果比较稳定。Percoll 法处理精子卵裂率要显著高于上浮法，但是囊胚率和囊胚细胞数差异不显著。上浮法的精子镜检活力要好于 Percoll 法分离的精子。但是，以上分析的不同获能物 and 不同分离方法，总体受精率、发育率还很低，所以在山羊精子获能中，还需要大量的试验研究。

第四章 山羊胚胎体外培养

自 1957 年哺乳动物早期胚胎体外培养在小鼠上获得成功到现在, 多种试管动物、克隆动物、转基因动物等相继出生, 胚胎培养取得很大进展。但是成功率低, 原因是卵母细胞质量差、克隆再程序化不清楚、以及胚胎体外培养体系不完善, 导致胚胎质量下降, 妊娠率降低, 胎儿畸形率高。目前, 建立一个完善的胚胎培养体系, 是胚胎在体外能够正常发育到囊胚的重要环节。在输卵管和子宫内, 发育环境呈连续动态变化, 为胚胎发育提供各种胚胎营养因子, 及时排出代谢废物。经测定发现, 输卵管和子宫液中含有糖蛋白质, 多种氨基酸, 特别是甘氨酸和丙氨酸浓度最高, 这些物质主要是雌激素诱导输卵管上皮分泌产生的^[337]。在体外培养过程中, 只有模仿胚胎体内发育环境, 为体外胚胎生长提供必要的营养因子, 合理的抗氧化措施, 并且及时地将代谢废物和不利于胚胎发育的物质排出, 才能提高胚胎的发育数量和质量。而且早期胚胎体外培养存在发育阻滞期, 如小鼠发生在 2-细胞期、猪在 4-细胞期、绵羊和牛发生在 8~16-细胞期, 山羊早期胚胎阻滞期在 2-细胞和 8-细胞期, 发育阻滞可能是由于基因由母源性向合子性转化引起的^[338, 339]。因此, 克服胚胎体外发育阻滞是胚胎发育到囊胚的关键环节。如使用共培养系统, 能够有效克服牛、猪等体外胚胎发育阻滞^[340]。山羊早期胚胎体外培养较为困难, 使用体细胞共培养可以改善发育阻滞。如在低氧浓度下和使用人血清, 可以成功的将胚胎培养到孵化囊胚^[341], 用 SOF (输卵管培养液) 和 CR1 培养获得囊胚, 但是结果不理想, 与牛胚胎体外发育相距甚远。本试验旨在通过优化培养程序, 筛选培养液, 建立适合于山羊胚胎体外发育体系, 提高囊胚发育率。

1 材料和方法

1.1 卵母细胞体外成熟和受精

屠宰山羊卵巢的采集方法见第二章。收集 A 级卵丘-卵母细胞复合体 (COCs) 进行成熟培养, 培养条件和成熟液见第二章, 即使用优化后的培养方法, 如成熟培养 27h 等。体外受精方法见第三章。

1.2 胚胎培养

1.2.1 颗粒细胞制备

将成熟后扩展良好的卵母细胞的颗粒细胞吹打掉, 2000rpm 离心, 收集, 然后按 3×10^3

接种到胚胎培养液中，并且添加 10%的 FCS，继续培养待用。

1.2.2 输卵管上皮制备

选取卵巢上附带的输卵管，在 PBS 液中冲洗 4 次。然后将输卵管剖开，使用刀片刮取输卵管上皮细胞，然后将得到的碎片使用胰蛋白酶消化后，TCM199 + 10% FCS 进行传代培养。用之前，提前 2d 制备共培养系统(见图 4-1)。

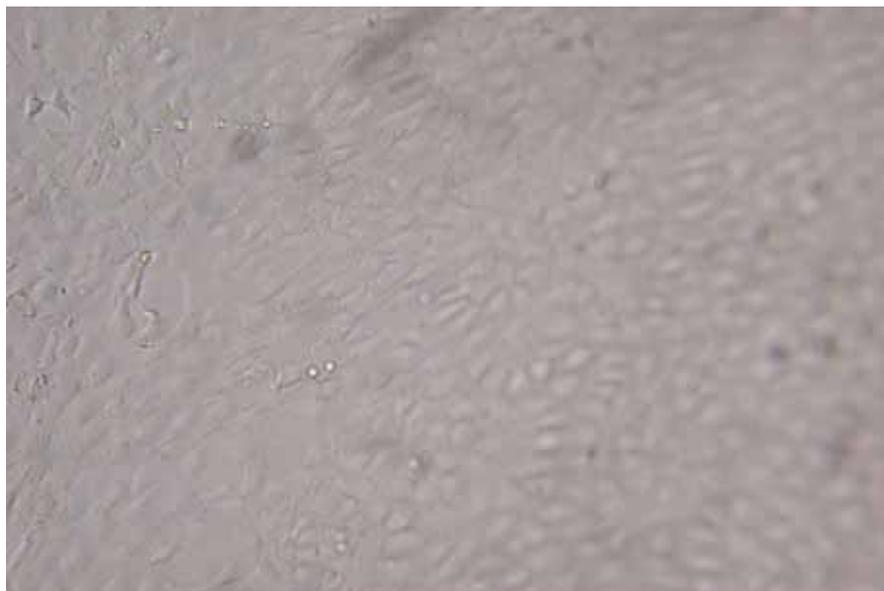


图 4 - 1 山羊胚胎的共培养细胞层

Plate 4 - 1 The co-culture cell layer for goat embryos

1.3 胚胎培养

卵母细胞受精 24h 后，将受精卵在 PBS 液中冲洗三次，将外周的残余物质，特别是精子冲洗掉，颗粒细胞留取部分，然后进行分组培养。培养液分别为 TCM199 (Gibco BRL)、CR1^[342]、SOF^[343] (输卵管培养液)，添加 10% FCS 或 0.3 mg/ml BSA。在培养液 CR1 添加必需氨基酸溶液和非必需氨基酸溶液 (1:2 Gibco BRL); 在 SOF 中添加必需氨基酸溶液和非必需氨基酸溶液为 4:1。

培养液用移液器量取 1ml，在凹型 (30 mm) 培养皿共培养，上边覆盖矿物油 (Sigma 公司)，培养 48h 后换液，继续培养。

1.4 囊胚细胞计数

囊胚期胚胎用 Hoescht 33342 染液染色 30 min，其浓度为 0.1 mg/ml 溶于 SOF，然后在倒置显微镜下，200× 荧光计数。

2 结果

2.1 不同共培养系统对受精后胚胎发育的影响

颗粒细胞和输卵管上皮细胞共培养条件下，体外受精胚胎的卵裂率分别为 46.3%和 40.8%，显著高于无共培养体系组 28.1%；发育到 8~16 细胞的胚胎比率分别为 49.1%和 45.0%，极显著高于无共培养组 5.7%；囊胚数比率分别为 17.6%、20.0%，极显著高于对照组。详细结果见表 4-1。受精卵卵裂情况见图 4-2、图 4-3。

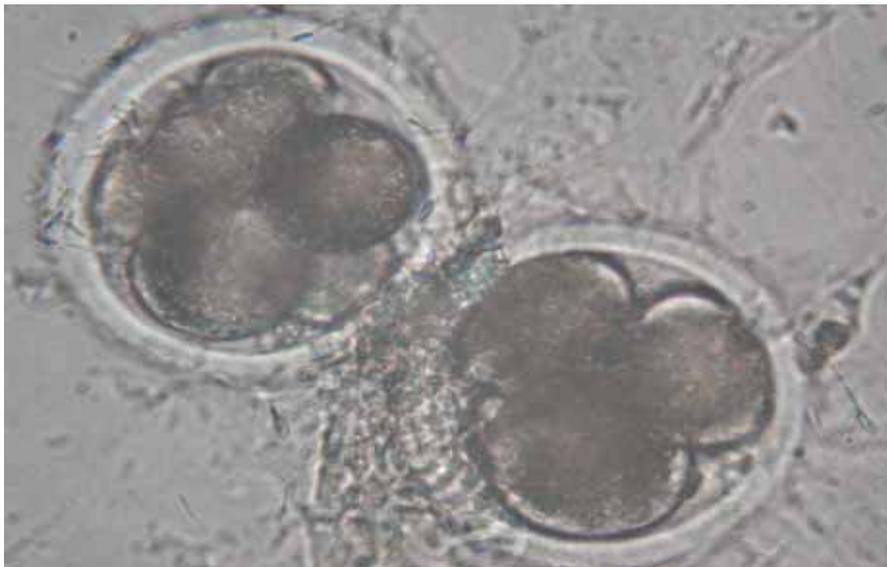


图 4 - 2 4-细胞、8-细胞体外受精、体外培养山羊胚胎

Plate 4 - 2 The 4-cell and 8-cell goat embryos of IVF/IVC



图 4 - 3 8-细胞体外受精、体外培养山羊胚胎

Plate 4 - 3 The 8-cell goat embryos of IVF/IVC

表 4 - 1 不同共培养系统对受精后胚胎发育的影响 (重复 3 次)

Table 4 - 1 The effects of different co-culture systems on the embryo development(with three replications)

共培养体系	卵母细胞	卵裂 (%)	8~16-细胞 (%)	囊胚 (%)
Coculture system	Oocytes	Cleaved number (%)	8~16-cell (%)	Blastocyst (%)
---	103	29 (28.1) ^b	6 (5.7) ^c	0 (0) ^c
颗粒细胞 (CC)	110	51 (46.3) ^a	25 (49.1) ^a	9 (17.6) ^a
输卵管上皮细胞 (OEC)	98	40 (40.8) ^a	18 (45.0) ^a	8 (20.0) ^a

CC:cumulus cell ; OEC:Oviductal epithelial cells

上标 a, b, c 为差异显著即 (P<0.05)

^{a, b, c} different superscripts within columns are significantly different (P<0.05)

2.2 胚胎培养液中添加 BSA、FCS 和不同换液程序对胚胎发育的影响

试验设计主要是根据胚胎发育的需要建立一套合理的换液程序。表 4-2 列出了胚胎培养液中添加 BSA、FCS 对卵裂数 (率) 和囊胚数 (率) 的影响。可见, 使用含 BSA 培养液的两组, 前 48h 培养获得的卵裂率分别为 53.7%和 51.7%, 而使用含 FCS 的培养液前 48h 培养获得的卵裂率仅为 41.2% (P<0.05)。但是获得相对于卵裂数的囊胚率, 还是先使用 BSA 组, 48h 后换液使用 FCS 的效果 (囊胚率为 34.7%) 显著优于单独添加 BSA (囊胚率 23.1%)。和 FCS (囊胚率 20.1%)。发育到囊胚情况见图 4-4。



图 4 - 4 体外受精扩张囊胚

Plate 4 - 4 The completely hatching goat blastocyst of IVF/IVC

表 4 - 2 胚胎培养液中添加 BSA , FCS 对胚胎发育的影响 (重复 3 次)

Table 4 - 2 The effects on the embryo development by supplemented BSA and FCS

培养系统 Culture system	换液顺序 Replacement Order	受精卵 Zygote numbers	卵裂 (%) Cleaved / Oocyte (%)	囊胚 (%) Blastocyst/ Cleaved (%)
SOF+ 10%FCS	48h 后, 同前	135	56 (41.2) ^b	11(20.1) ^b
SOF+ 3mgBSA	48h 后, 同前	147	78 (53.1) ^a	18(23.1) ^b
SOF+ 3mgBSA	48h 后, 换为 SOF+ 10%FCS	139	72 (51.7) ^a	25(34.7) ^a

上标 a, b 为差异显著即 (P<0.05)

^{a, b}different superscripts within columns are significantly different(P<0.05)

2.3 不同培养液在共培养系统的支持下对胚胎发育的影响

选取不同培养液 SOF、CR1 和 TCM-199 进行胚胎培养, 卵裂率分别为 50.4%、50.0% 和 46.0%, 差异不显著; 桑椹胚比率分别为 27.9%、25.5%和 23.0%, 差异不显著; 囊胚数比率分别为 16.4%、16.4%和 15.3%, 同样差异不显著。但在这三种培养液中, 胚胎发育有下降的趋势, 即 TCM-199 作为培养液时, 卵裂率、桑椹胚率及囊胚率都最低。本研究全部采用颗粒细胞共培养系统, 在培养前 48h, 使用基础培养液+BSA 培养, 48h 后换液添加 10%的 FCS 继续培养, 观察并记录实验结果 (表 4-3)。

表 4 - 3 不同培养液在有共培养系统支持下对体外胚胎发育的影响 (重复 3 次)

Table 4 - 3 The effects of different media supported by co-culture system on the embryo development (three repetitions)

培养液 Maturation medium	受精卵 Zygote numbers	卵裂(%) Cleaved/ oocyte (%)	桑椹胚(%) Morula cleaved (%)	囊胚(%) Blastocyst/ cleaved (%)
SOF	121	61 (50.4) ^a	17(27.9) ^a	10(16.4) ^a
CR1	110	55 (50.0) ^a	14(25.5) ^a	9(16.4) ^a
TCM-199	113	52 (46.0) ^a	12(23.0) ^a	8(15.3) ^a

上标 a, b 为差异显著即 (P<0.05)

^{a, b}different superscripts within columns are significantly different(P<0.05)

3 讨论

3.1 不同共培养系统对受精后胚胎发育的影响

体细胞共培养能提供胚胎生长所需的因子，克服胚胎发育阻滞，促进早期胚胎体外发育。它不仅提供生长因子，而且还能清除培养液中胚胎毒性物质^[233]。此外，能降低胚胎氧应急，提高系统抗氧化能力。氧应急对胚胎的发育副作用很大，如果没有共培养条件，将氧浓度降到 5%，同样能提高囊胚发育^[344]。在山羊卵母细胞成熟培养及胚胎发育过程中，颗粒细胞^[345]和输卵管细胞^[33]都能支持发育到囊胚阶段。也有报道颗粒细胞不能像输卵管上皮，促进胚胎发育^[346]。Yadav 比较山羊输卵管上皮和水牛输卵管上皮共培养山羊胚胎，发现二者没有差异，都能够显著提高山羊体外受精卵裂率和胚胎发育率。而没有共培养的胚胎，卵裂率显著降低，胚胎大部分发育阻滞在 16 细胞期^[347]。研究表明，颗粒细胞和输卵管细胞共培养并没有发育差异，即卵裂率分别为 46.3%和 40.8%，8~16 一细胞的胚胎比率分别为 49.1%和 45.0%，均显著高于无共培养体系组。而且囊胚数比率分别为 17.6%和 20.0%，极显著高于对照组。说明共培养细胞类型以及物种类型对胚胎发育影响差异不大，而显著优于无共培养系的发育率。所以，只要使用共培养细胞能够很好地克服山羊胚胎 8~16 一细胞阻滞。此外共培养能够显著提高胚胎的卵裂率，而且所得囊胚的孵化能力加强。

目前，在山羊胚胎培养中，体细胞共培养还是必不可少的^[348]。但是共培养所得胚胎质量低于体内胚^[349]，其超微结构及胚胎工程后技术操作，如 ES 细胞的分离培养上都体现出体外共培养胚及孤雌激活胚的质量明显不如体内胚（见第五、六章）。郭继彤在山羊孤雌胚胎培养中也得出相同的结论，只是囊胚发育远不及牛等其它动物，并且发现 8~16 细胞阻滞在孤雌激活胚胎中不明显^[267]。

3.2 胚胎培养液中添加 BSA、FCS 和不同换液程序对胚胎发育的影响

胚胎在体外培养过程中，远远不及体内环境，属于静态培养条件，所以培养过程中，会出现代谢废物堆积和营养不能满足需要的情况。因此，只有克服这些不利因素，才能获得良好的效果。

目前，血清在胚胎培养中还是首选蛋白来源，而且包含许多生物活性因子，如激素等，为胚胎正常发育提供营养。但是添加血清，培养成分复杂，不利于检测成分，而且血清的批次不同，培养效果差异很大^[350]。此外血清对胚胎发育有双重性，也就是胚胎发育早期有抑制效应，而对发育后期又有促进作用。也有学者报道，胚胎体外发育过程中，添加血清是没有必要的，主要由是否有共培养和基础培养液决定^[351~353]。如果基础培养液简单，血清的添加就必须^[354]。而本研究结果表明，在早期卵裂时期，添加 BSA 的培养液（两组）所得的卵裂率要显著高于添加 FCS 的培养液（分别为 51.7%、53.1%、41.2%），在发育后期，

即 48h 后由 BSA 换为添加 FCS 促进胚胎向囊胚发育，即囊胚率 (34.7%) 显著高于单独使用 BSA 组 (23.1%) 和 FCS 组 (20.1%)。这表明在胚胎发育早期，卵母细胞本身储备的物质与 BSA 就完全能够满足发育的需要；到后期，胚胎细胞数要快速分裂，还需含 FCS 的共培养系统提供营养，所以添加血清就很有必要，而且也克服了血清抑制卵裂及早期胚胎发育的缺点。在牛胚胎体外培养中使用 FCS，能够加速胚胎的体外发育，但是也出现了囊胚雄性胚胎比例升高的现象。郭继彤等发现，在培养过程中，对于孤雌山羊胚胎，只需添加 BSA，一次就可以达到囊胚^[355]。但本试验得出，在培养过程中，必须换液，而且血清对囊胚的发育也是必须的。所以，在山羊体外受精胚胎培养中，血清的添加是必须的，特别是发育后期，而且效果要优于单独添加 BSA。最佳的程序是先使用含 BSA 培养液，48h 后换为 FCS，培养效果较为理想。

3.3 不同培养液在共培养系统的支持下对胚胎发育的影响

胚胎培养液对胚胎的发育是至关重要的。胚胎在输卵管和子宫角虽然呈游离状态，但是子宫乳和卵黄为胚胎发育提供了必需的营养物质，并且能够及时把代谢废物排除，所以胚胎在体内发育质量很好。但是在体外培养下，环境相对固定，胚胎毒性物质不能及时排出。因此必须设计一种模拟体内发育的培养液。通过测定非必需氨基酸和必需氨基酸，在输卵管和子宫的比例分别为 5:1 和 2:1，一些特定的氨基酸如丙氨酸、谷氨酸、氨基乙酸和牛黄酸浓度也显著高于其它，说明这些氨基酸在胚胎发育早期起重要作用^[356]。SOF 和 CR1 就是依据体内发育系统设计的培养液，配制简单，所以常常用它们来替代 TCM199 培养胚胎。Izquierdo (2001) 报道，TCM199 在有输卵管细胞共培养下，囊胚发育高于 SOF，高达 21.3%^[357]。但本试验结果表明，SOF、CR1 和 TCM199 三种培养液对胚胎发育没有明显的差异，但 SOF、CR1 的培养效果有优于 TCM199 的趋势。而且本试验配制的 SOF 和 CR1 也添加了一定比例的必需氨基酸和非必需氨基酸，较好地满足了胚胎发育的营养需求。Wrenzycki (2001) 通过对牛体外胚胎试验的研究也得出 SOF 比 TCM199 更为接近体内胚胎发育要求的结论，且 CR1 与 SOF 没有差异^[356]。所以，在山羊胚胎培养中，基础培养液还是选用配制简单的 SOF (CR1 也可以使用)，添加 BSA/FCS 才能得出较为理想的结果。但是目前，与牛胚胎相比，山羊胚胎体外发育率很低，质量差而且囊胚细胞数也仅为体内胚的一半。因此，山羊胚胎培养体系的优化还需要进一步研究。

4 结论

颗粒细胞和输卵管细胞共培养并没有发育差异，说明共培养细胞类型对胚胎发育影响差异不大，而显著优于无共培养体系的发育率。进一步说明，只要使用共培养方法就能够很好地克服山羊胚胎 8~16-细胞阻滞。在早期卵裂时期，添加 BSA 的卵裂率要显著高于

添加 FCS。而在发育后期，即 48h 后由 BSA 换为添加 FCS 促进胚胎向囊胚发育，即囊胚率 (34.7%) 显著高于单独使用 BSA 组 (23.1%) 和 FCS 组 (20.1%)。可见，在胚胎发育早期，卵母细胞本身储备的营养物质与 BSA 就完全能够满足发育的需要；到后期，胚胎细胞数要快速分裂，还需含 FCS 的共培养系统提供营养。所以，在山羊胚胎培养中，基础培养液还是选用配制简单的 SOF (CR1 也可使用)，添加 BSA/FCS 才能取得理想的效果。

第五章 山羊体外胚胎和体内胚胎的超微结构比较

目前体外生产胚胎不论从形态、质量上都不如体内发育的胚胎。体外胚胎移植产子率低，卵裂球显著少于体内胚，山羊胚胎亦如此。牛体外胚胎表现卵裂球少，细胞间连接松散，而且形态质量和发育率上差异很大^[358~360]，牛体外胚胎移植成功率远远低于体内发育的胚胎^[361, 362]。牛胚胎培养液中添加血清，胚胎中脂滴含量增加，抗冷冻能力减弱，而利用无血清培养液得到的胚胎空泡化和脂滴含量较少。说明在实验室生产胚胎过程中，对于胚胎的体外发育特点及所需的环境条件了解还不够。目前还没有对山羊体外胚胎与体内胚胎超微结构的研究报道。为了进一步改善体外胚胎的质量，本试验拟就山羊体外胚胎和体内胚胎的超微结构差异进行研究。

1 实验材料和方法

1.1 体内胚胎的生产

选取体况较好的山羊，首先放阴道栓 (CIDR-B, 新西兰产) 9天，然后使用促卵泡素(FSH Flototropin-V, 澳大利亚产) 进行超数排卵。超排程序采用逐量递减的方法，总剂量为10ml，早晚各一次，连续注射8次。在第7次时撤阴道栓，同时注射氯前列烯醇0.2 mg (上海市计划生育所)，观察发情配种。配种结束后，6~7d通过手术在子宫角回收胚胎，待用。

1.2 体外胚胎的生产

1.2.1 卵母细胞成熟

收集卵母细胞，选取A级，即胞质均匀，外围颗粒细胞包裹至少有3层以上的卵母细胞进行成熟培养，方法同第二章。

卵母细胞成熟液是TCM-199+25 mol/l Hepes + 2.2 g/l NaHCO₃+0.11 g/l 丙酮酸钠+0.06 g/l青霉素+0.1 g/l 链霉素+10% FCS。添加激素为，10 μg/ml FSH, 10 μg/ml LH 1 μg/ml E₂。体外成熟在38.5℃，5% CO₂，饱和湿度成熟培养27h。

1.2.2 精子体外获能和受精

使用第三章方法，分离活精子。然后在50ul受精微滴中受精，精子密度为6×10⁵个/ml。受精获能液是BO液，加6 mg/ml BSA+50 μg/ml 肝素钠，精卵孵育24h。

1.3 试验设计

1.3.1 受精卵分组

将受精卵分成两组，使用SOF+BSA培养48h换液，第一组利用SOF+10% FCS培养，第二组利用SOF+0.3 mg/ml BSA培养，培养时间均为120h，收集桑椹胚和囊胚备用。操作程序参照第四章。

1.3.2 观察内容

电镜观察体内及体外胚胎的形态、细胞器数量、线粒体形态数量、胞间连接、胞内含物的差异。

1.4 电镜切片制备

1.4.1 电镜切片的制作

将山羊体外培养的（分别在SOF+FCS和SOF+BSA）囊胚、体内桑椹胚和囊胚分别取10枚固定。电镜切片的制作程序为：将胚胎先用含2.5%戊二醛和0.75%低聚甲醛PBS液固定数日，再在0.1M 的二甲砷磷酸缓冲液中短暂冲洗，之后用2%锇酸二钾磷酸钠缓冲液固定60分钟。固定后用乙醇逐级脱水，用Epon812bA包埋和进行常规切片机切片，然后用醋酸铀和柠檬铅双染色后，在透射电镜上观察及摄影^[73]。

1.4.2 线粒体的观察

观察电镜切片上细胞内的线粒体，并对每个视野内的线粒体进行计数，包括线粒体总数、成熟线粒体数量、畸形线粒体数量并计算百分比。

2 结果

对体内胚和体外胚、体外不同培养体系培养的胚胎（分别为SOF+FCS和SOF+BSA培养体系）的超微结构比较。电镜观察发现，体内胚胎形态整齐，细胞间隙整齐紧密，脂滴含量小而少（图5-1）；体外胚细胞间隙松散，脂滴含量远远多于体内胚胎，而且分布不均，大小不一致（图5-2）。不同培养体系也显示超微结构的差异，如在SOF+BSA培养体系中，相对于添加FCS组，脂滴较少，但与体内胚相比，明显结构不整齐，有空泡化。从线粒体形态看，体内胚胎成熟线粒体多以线形出现，线粒体脊清晰完整，而体外胚胎线粒体畸形率高，以球形或卵圆形线粒体居多，空泡化严重，线粒体脊少（图5-3，图5-4）。体外胚胎出现凋亡小体较体内胚胎多（图5-5，图5-6）。

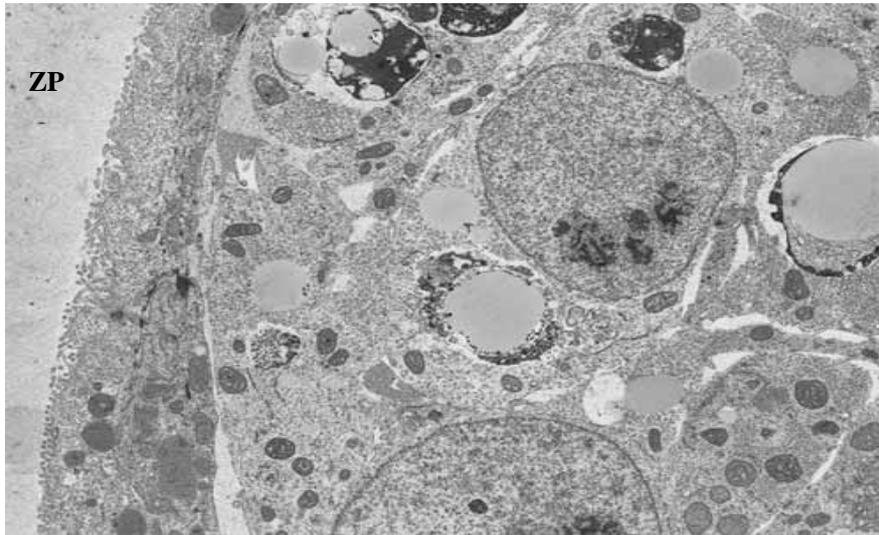


图 5 - 1 体内胚胎超微结构 (形态整齐 24000 ×)

Plate 5-1 The ultrastructure of goat embryo in vivo

图示说明: ZP 是透明带

Explanation: ZP symbeled zone pellucida

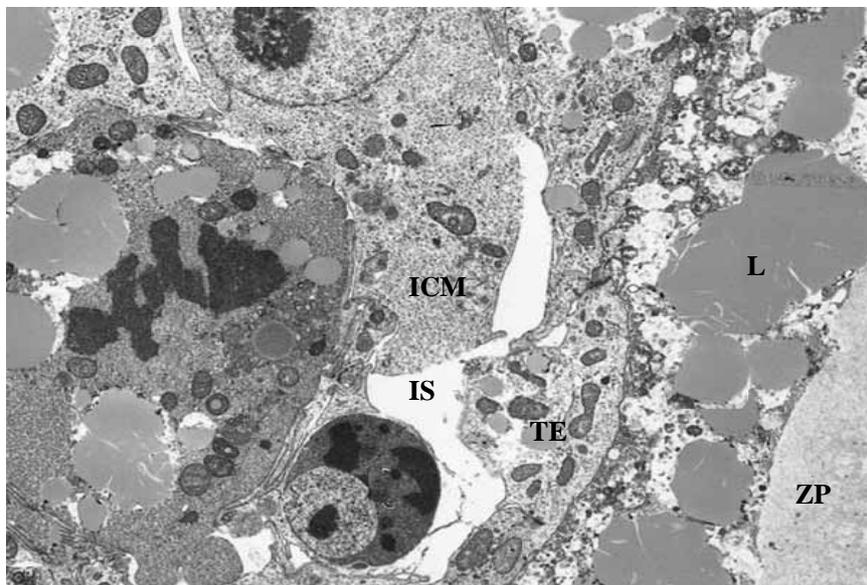


图 5 - 2 山羊体外胚胎的超微结构 (18000 ×)

Plate 5 - 2 The ultrastructure of goat embryo in vitro

图示说明: IS 是细胞间隙, L 是脂滴, ZP 是透明带, TE 是滋养层细胞, ICM 是内细胞团

Explanation: IS symbeled interval, L symbeled lipid droplet, ZP symbeled zone pellucida

TE symbeled trophoctodeim, ICM symbeled inner cell mass

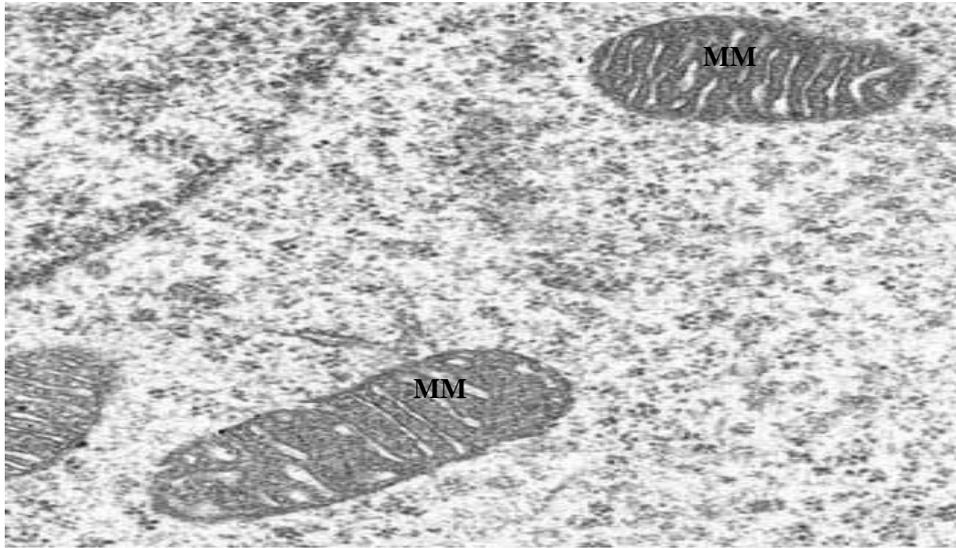


图 5 - 3 山羊体内胚成熟线粒体超微结构 (线性成熟线粒体 36000 ×)
 Plate 5-3 The ultrastructure of the matured lined mitochondria of goat embryo

图示说明: MM 是成熟线粒体
 Explanation: MM symbolized matured mitochondria

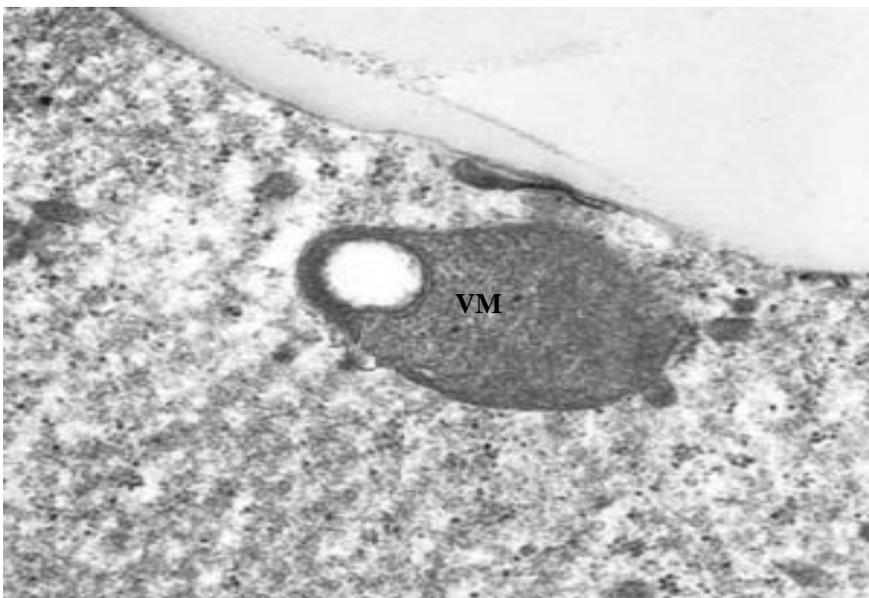


图 5 - 4 山羊体外胚空泡化线粒体超微结构 (36000 ×)
 Plate 5 - 4 The ultrastructure of the vacuolated mitochondria of goat embryo in vitro

图示说明: VM 是成熟线粒体
 Explanation: VM symbolized vacuolated mitochondria

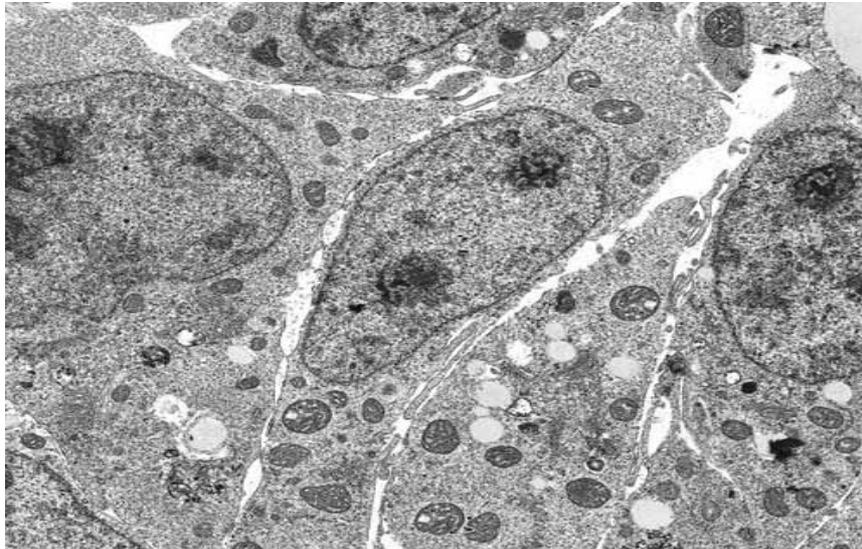


图 5 - 5 山羊体内胚超微结构 (细胞间隙整齐紧密, 脂滴含量少) 18000 ×
Plate 5—7 The ultrastructrue of the goat embryo in vivo18000×(18000×)

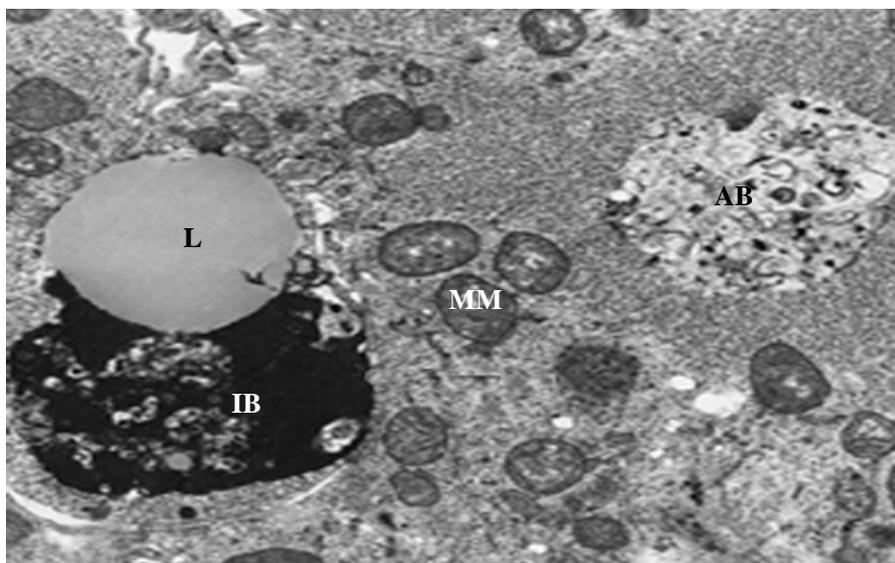


图 5 - 6 山羊体外胚凋亡小体超微结构 (36000 ×
Plate 5—8 The ultrastructrue of the apoptosis body of goat embryo in vitro

图示说明: MM 是成熟线粒体, L 是脂滴, IB 是包涵体, AB 是凋亡小体,
**Explanation: MM symboled matured mitochondria, L symboled lipid droplets,
 IB symboled inclusive body , AB symboled apoptised body**

表 5 - 1 山羊体外胚和体内胚线粒体畸形和脂质体的分布
Table 5 - 1 The mitochondria deformity and Lipid bodies distribution of in vitro and in vivo goat embryos

胚胎来源 Embryo sources	脂质分布 Lipid body distribution	成熟线粒体 (%) Maturated mitochondria (%)	细胞间隙程度 Cell gap junction	凋亡小体 Apoptosis body
体内胚胎	少,均匀	85.8 ^a	紧密	少
SOF+10% FCS	多,大,分布不均	53.2 ^c	松散	多
SOF+BSA	介于两者	61.9 ^b	松散	多

上标 a, b, c 为差异显著即 (P<0.05)

^{a, b, c} different superscripts within columns are significantly different (P<0.05)

3 讨论

体外培养胚胎已经有几十年的历史，但是体外培养胚胎质量差，并且形态变化多样。如山羊体内胚胎在普通显微镜下观察，胚胎内细胞致密，透光度小，色泽较暗，外周隙有一定的空间；而体外胚胎细胞轮廓清楚，数量少，色泽淡，有松散的细胞（图 5—7）。移植后体外胚比体内胚的妊娠率降低很多，造成流产、胎儿畸形等。说明体外胚胎培养体系不能很好的支持胚胎发育。另外从胚胎的超微结构也能反映出胚胎的生理特性。



图 5 - 7 山羊体外受精扩张囊胚 (100 ×)

Plate 5—7 The goat hatching blastocyst of IVF (100 ×)

体内胚形态整齐，细胞间隙紧密，脂滴含量少。体外胚胎细胞间隙大，脂滴含量比体内胚显著增加，而且在两种体外培养液中，含有 FCS 组的脂滴含量又高于 BSA 组（图 5—8，图 5—9）。表明在体外生产的胚胎，脂滴的形成与培养液有关系，说明 FCS 更能增加

胚胎脂滴的沉积^[363]，脂滴聚集可能是胚胎细胞膜破裂的分解产物，自身的卵裂球很少，而由膜脂聚集而成。Abe 等 (1999) 对比牛体外生产胚胎也表明，无血清培养所获囊胚的细胞器界线清楚，线粒体成熟，而添加血清培养后，胚胎脂滴增多，界限模糊^[364]。

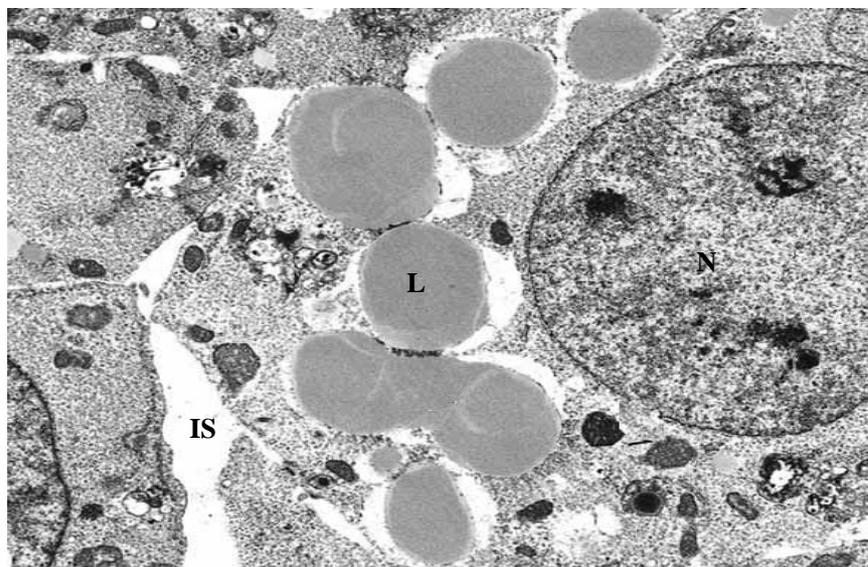


图 5 - 8 山羊体外胚胎超微结构 (SOF + FCS 培养体系, 24000 ×)
Plate 5-8 The ultrastructure of goat embryo in vitro (SOF + FCS system)

图示说明: IS 是细胞间隙, N 是细胞核, L 是脂滴

Explanation: IS symbolized interval, N symbolized nuclear, L symbolized lipid droplet

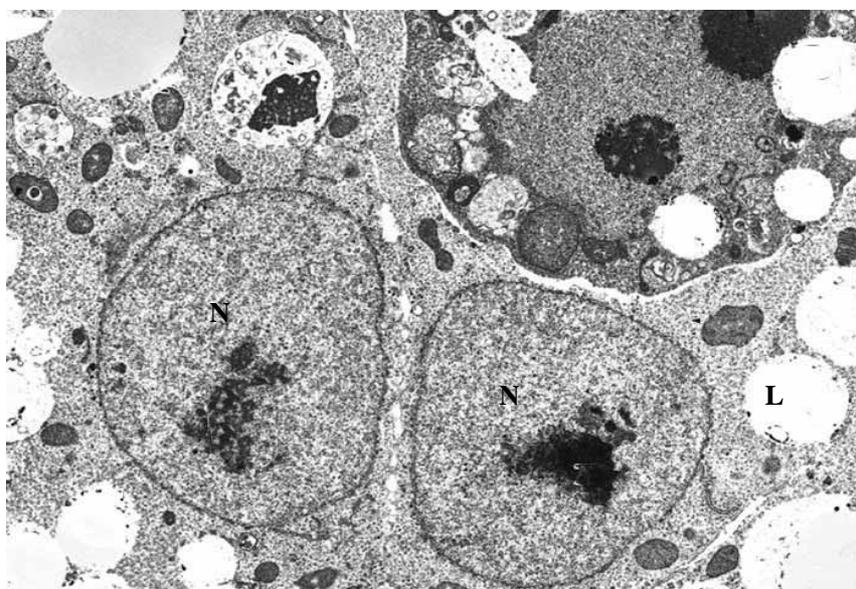


图 5 - 9 山羊体外胚胎超微结构 (SOF + BSA 培养体系, 24000 ×)
Plate 5-9 The ultrastructure of goat embryo in vitro (SOF + BSA system)

图示说明: N 是细胞核, L 是脂滴,

Explanation: N symbolized nuclear, L symbolized lipid droplet

体外胚胎线粒体的异常率要显著高于体内胚胎，如线粒体不成熟，线粒体脊破坏较为严重，ATP 含量下降，产生能量代谢障碍，也是脂滴堆积的原因。体外生产胚胎线粒体总数也要多于体内胚胎，但成熟线粒体明显减少（85.8% vs 61.9%）。这表明体外培养条件不能满足线粒体正常繁殖和运转。由于线粒体代谢过量，造成大量线粒体畸形。不成熟的线粒体存在较少的脊和 ATP，胚胎的能量代谢受到不同程度的影响，进而影响到需要能量的一切发育。

胚胎细胞凋亡是正常的生理现象。在灵长类动物的卵母细胞老化过程中，线粒体首先有空泡化，随后细胞凋亡，但是体内胚胎凋亡现象较体外胚胎很少发生^[365]。本研究，体外培养的山羊胚胎中，线粒体的空泡化现象严重，预示着细胞老化，提前衰退并凋亡。在小鼠体内胚胎也能发现有空泡现象，只是程度较轻而已，这些包涵体内的碎片可能是细胞自行消化和代谢的产物。山羊体外胚胎要比体内胚胎含有不同程度的包涵体、凋亡小体和碎片。虽然不能用有没有空泡说明细胞老化，但也说明空泡化是老化的表现形式之一。

体外胚和体内胚在核质比上有较大差异，体外胚要显著小于体内胚，说明体内胚胎的核遗传物质转录要高于体外胚胎。胚胎细胞间隙连接，体内胚胎要多于体外胚胎^[364]，而且连接紧密。Ott等 (2002) 对比牛体内胚胎滋养层细胞和内细胞团界线清晰，微绒毛和线粒体丰富，线粒体呈线性，并且有清晰的线粒体脊^[366]。本研究中，BSA培养接近体内胚胎，但是血清培养呈现不规则的超微结构，表现在细胞器减少，而细胞内含物多，如脂滴、空泡，碎片，卵形线粒体且脊不清晰。研究表明，添加血清组囊胚的质量要比BSA组下降，但囊胚的数量要多于BSA组，这是一个很突出的矛盾。

培养液中添加血清培养获得的囊胚电镜显示，大的脂滴为亲和性脂滴，说明不饱和脂肪酸含量很高，线粒体多以不成熟的球形或卵圆形的线粒体存在。而在无血清而含有BSA的培养液中，桑椹胚和囊胚细胞内有许多成熟的线粒体存在，而且成熟孵化率也是无血清培养基要多于有血清培养基。说明血清组培养异常，增加了胞质中的脂滴含量，进而会影响到冷冻后胚胎存活的效果^[367, 368]。

4 结论

体内胚胎和体外胚胎超微结构对比分析表明，山羊体外胚胎质量要比体内发育胚差。主要原因是体外胚胎包含大量脂滴、畸形线粒体以及空泡化严重、细胞间隙连接较少且松散、核质比下降等。要获得高质量的胚胎，目前建立的山羊胚胎培养体系还需进一步完善。

第六章 山羊胚胎干细胞的分离培养

胚胎干 (embryonic stem, ES) 细胞是从附植前早期胚胎内细胞团 (inner cell mass, ICM) 分离培养出来的一种具有自我更新、无限增殖能力、能分化成代表 3 个胚层组织细胞能力的干细胞。可以对其进行遗传操作、选择和冻存而不失其多能性。正因为 ES 细胞的这种特性,在生物学基础研究、农业以及移植医学上具有广阔的应用前景。Evans 和 Kaufman (1981) 用延迟胚胎着床的方法分离 ICM, 以 STO 为饲养层, 首次成功分离得到小鼠 ES 细胞^[261]。后来许多学者尝试分离培养家畜 ES 细胞^[369], 取得不少进展。但在羊上, 仿照小鼠 ES 细胞的建系方法很难成功。这可能是由于不同物种间早期胚胎发育模式不同的缘故。Tsuchiya 等 (1994) 用免疫外科法分离 8~9 d 绵羊囊胚 ICM, 培养于 STO 细胞饲养层上, 得到 2 个 ES 细胞系, 但生长速度很慢, 只传至 4 代^[296]。Tillmann 等 (1996) 用胎牛肝成纤维细胞作饲养层分离得到传至 20 代的绵羊 ES 细胞和 40 代的山羊类 ES 细胞系^[298]。Campbell 等 (1996) 用第 1~3 代的 ES 细胞作核供体进行核移植, 得到 4 只绵羊^[299]。国内至今还没有见到有关山羊 ES 细胞研究的报道。本研究首次使用体内受精胚、体外受精胚和孤雌激活胚三种不同来源的囊胚为材料, 通过比较不同饲养层种类、血清种类以及不同的培养液对山羊 ES 细胞分离培养的影响, 筛选出适合山羊 ES 细胞分离培养的培养条件, 将一株 ES 细胞系传至 6 代, 为进一步建立山羊 ES 细胞系奠定基础。

1 材料

1.1 实验动物

昆明白小鼠, 6~8 周龄, 体重 15~20g, 健康无病。繁殖正常的健康山羊。

1.2 主要试剂

DMEM (高糖):Gibco BRL Lot No.1101712

胎牛血清 (FCS): HyClone Lot No.ALK14879

新生牛血清(NCS): 北京元亨圣马生物技术研究所 No.020822

丝裂霉素-C: Sigma Lot No.31K2508

胰蛋白酶: Gibco BRL Lot No: 1118374

EDTA: Gibco BRL Lot No.1120193

β -巯基乙醇: Merck 分装

非必需氨基酸: Sigma

LIF (白血病抑制因子 leukemia inhibitory factor): Sigma 公司

IGF-I (胰岛素生长因子 insulin like factor I): Sigma 公司

FSH: 10 mg/瓶, 中科院动物研究所

PG: 0.2 mg/支, 宁波激素制药厂

孕激素阴道栓: CIDR-G, 新西兰产

PMSG: 天津市激素厂

1.3 主要设备

超净工作台: 苏州市医用净化设备厂

CO₂ 培养箱: ThermoForma

电子天平: METTLER TOLEDO

倒置显微镜: OLYMPUS

实体显微镜: OLYMPUS

恒温加热台: Leica

普通离心机: 上海手术器械厂

恒温磁力搅拌器: 常州国华电器有限公司

透明式冰柜: Haier

液氮罐: 豫新机械有限公司低温仪器厂

六孔细胞培养板: 瑞士(NUNC)

滤器、移液枪、玻璃培养皿、离心管、注射器、检卵皿、血细胞记数板、吸尿管(自制)、口吸管(自制)及剥离针(自制)等

2 方法

2.1 主要溶液配制

2.1.1 无钙镁 DPBS 缓冲液的配制

称取 NaCl 10.00g, Na₂HPO₄·12H₂O 1.44g, KCl 0.25g, KH₂PO₄ 0.25g, 用四蒸水将试剂溶于 500 ml 烧杯。磁力搅拌器搅拌直至完全溶解后, 用 1000 ml 容量瓶定容, 摇匀, 分装于 200 ml 的玻璃瓶中。15 磅高压灭菌 30 min, 4℃ 冰箱保存。

2.1.2 消化液的配制

0.25% 胰酶 + 0.04% EDTA 消化液的配制: 称取胰蛋白酶 0.5g 和 EDTA 0.08g, 溶入

200 ml PBS，常温磁力搅拌器搅拌直至彻底溶解，用 0.22 μm 孔径的滤膜过滤，无菌条件分装成小瓶 (4ml/瓶)， -20°C 冰箱冻存。

2.1.3 1mol/L β -巯基乙醇的配制

取 β -巯基乙醇原液 70 μl 溶于 10 ml 四蒸水中，用 0.22 μm 孔径的滤膜过滤，无菌条件分装，100 μl /支， -20°C 冰箱冻存。

2.1.4 DMEM 培养液的配制

将高糖 DMEM 粉剂 13.4g 和 NaHCO_3 3.7g 分别溶于 400 ml 四蒸水中，磁力搅拌器搅拌。完全溶解后，混合，再加四蒸水定容至 1000 ml， 5×10^4 IU 的青霉素和链霉素，用 0.22 μm 滤膜过滤，无菌条件分装 50 ml 的玻璃瓶， 4°C 冰箱保存。

2.1.5 丝裂霉素-C 溶液的配制

把 1 个包装的丝裂霉素-C (2mg) 溶解于含 10% NCS 的 200 ml DMEM 中，磁力搅拌器搅拌 30 min，用 0.22 μm 孔径的滤膜过滤，无菌条件分装于小青霉素瓶 (5 ml/瓶) -20°C 冰箱冻存。

2.1.6 0.1%明胶溶液的配制

称取 0.5g 明胶，溶于 500 ml DPBS 中，15 磅高压灭菌 30 min。0.22 μm 孔径的滤膜过滤。无菌条件分装，10 ml/瓶， -20°C 冰箱冻存。

2.1.7 LIF 的分装

称取 0.1g BSA，用 9ml DPBS 充分溶解，0.22 μm 滤膜无菌过滤，用注射器反复抽洗 LIF (1 个包装，10 μg)。100 μl /支分装，100 ng/支， -20°C 冰箱冻存。

2.1.8 AKP 染色液的配制

称取 2.0 mg α -萘酚磷酸盐，10.0 mg 坚固蓝 RR，121.4 mg Tris 盐，溶于 10 ml 四蒸水中，混合均匀，调至 pH 为 8.4，滤纸过滤使用。现配现用。

2.2 山羊 ES 细胞培养液

A 液：DMEM (高糖) + 15% FCS + 0.1 mmol/L β -巯基乙醇 + 0.01 mM 非必需氨基酸 + 100 IU/ml 青霉素 + 100 IU/ml 链霉素。

B 液：A 液 + 10 ng/ml LIF

C 液：B 液 + 10 ng/ml IGF

2.3 小鼠及山羊胎儿成纤维细胞饲养层的制备

2.3.1 小鼠胎儿成纤维 (MEF) 细胞的分离与培养

取妊娠 12~14d 昆明白母鼠，断颈处死后，酒精消毒腹部，无菌打开腹腔，取出整个子宫，置于预先孵育好的 DPBS 中。去除胎膜，取出胎儿。去除胎儿头、四肢、内脏、尾，用 DPBS 液清洗去除血污，眼科剪剪碎。加入适量的 0.25% 胰酶和 0.04% EDTA 37℃ 作用 10~15 min，轻轻吹打数次。等量细胞培养液中和，以终止消化。离散后的细胞，用孔径为 100 μm 的滤纱过滤，1000 rpm 离心 5 min，弃上清液。用细胞培养液 (DMEM + 10% NCS + 0.1 mmol/L β-巯基乙醇 + 100 IU/ml 青霉素 + 100 IU/ml 链霉素) 把细胞沉淀制成悬液，记数。调整细胞浓度接种在细胞培养皿中，添加细胞培养液，摇匀。在 37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养。45 min 后换液，以去除尚未贴壁的杂细胞与死细胞。每 48h 换液一次。

2.3.2 山羊胎儿成纤维 (GEF) 细胞的分离与培养

根据小鼠胎儿成纤维细胞的分离培养方法，用含青、链霉素的 DPBS 清洗 32d 山羊胎儿 4~5 遍。在 DPBS 中用手术剪剥离胎膜，去除血污。取胎儿的肌肉组织，DPBS 清洗 2~3 遍，眼科剪充分剪碎。加入适量的 0.25% 胰酶 + 0.04% EDTA 室温消化 15 min，等量细胞培养液中和终止消化。用带有 12# 针头的注射器轻轻吹打数次，过滤，1000 rpm 离心 5~10 min。弃去上清液，用细胞培养液把细胞沉淀制成悬液。在 38℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养。1h 后换液，以去除尚未贴壁的杂细胞与死细胞。以后每 48h 换液一次。

2.3.3 MEF 和 GEF 的继代培养

待成纤维细胞基本铺满培养皿底，吸去培养液，用 DPBS 清洗 2~3 次。加入 4 ml 0.25% 胰酶和 0.04% EDTA 细胞消化液消化 2~4 min，加等量细胞培养液终止消化，并用吸管吹打成单细胞悬液。1000 rpm 离心 5 min，用细胞培养液把所得细胞沉淀制成悬液，并调整细胞浓度 $1\sim 2 \times 10^6$ 个/ml。在含有 7ml 细胞培养液的培养皿 (直径为 9cm) 中，用加样器移入细胞悬液 1ml，震荡混匀。在培养箱饲养层细胞 (条件同上) 中培养。每 48h 换液一次。

2.3.4 MEF 和 GEF 饲养层的制备

挑取细胞刚好铺满皿底、生长旺盛的培养皿 (MEF 前 5 代，GEF 前 8 代)，吸去培养液，加入有丝分裂抑制剂丝裂霉素-C，在培养箱中处理 2~3h。吸去丝裂霉素-C，并用 DPBS 清洗 4~5 次，以确保丝裂霉素的完全去除。加入细胞消化液，作用 3~5 min，加入等量细胞培养液终止消化，吸管吹打成单细胞悬液，1000 rpm 离心 5 min。弃上清，细胞沉淀用细胞培养液制成悬液，调整细胞浓度为 3.0×10^5 个/ml。在用明胶处理过的六孔培养板中每孔加入 0.6 ml 细胞悬液。培养箱 (条件同上) 中培养，待用 (图 6-1、图 6-2)。

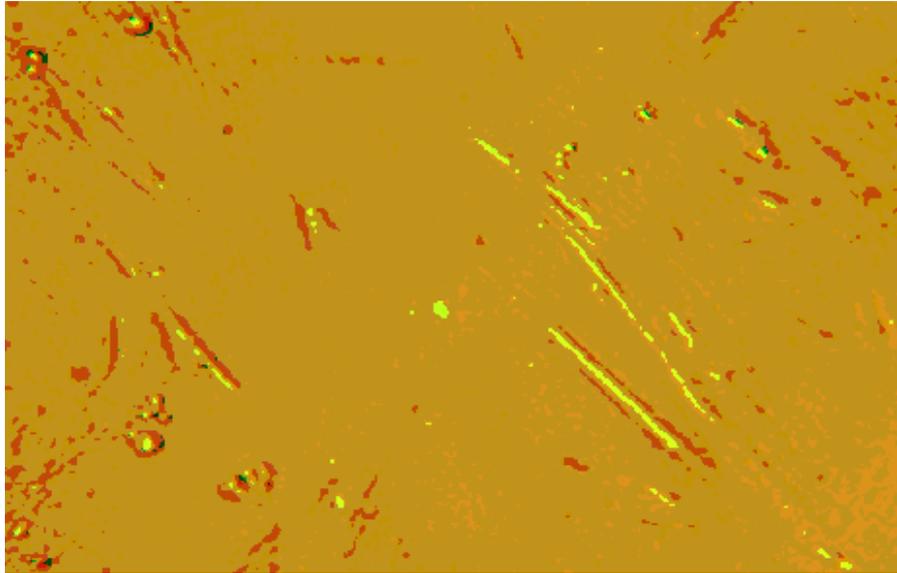


图 6 - 1 MEF 饲养层 100 ×
Plate 6—1 The feeder layers of MEF

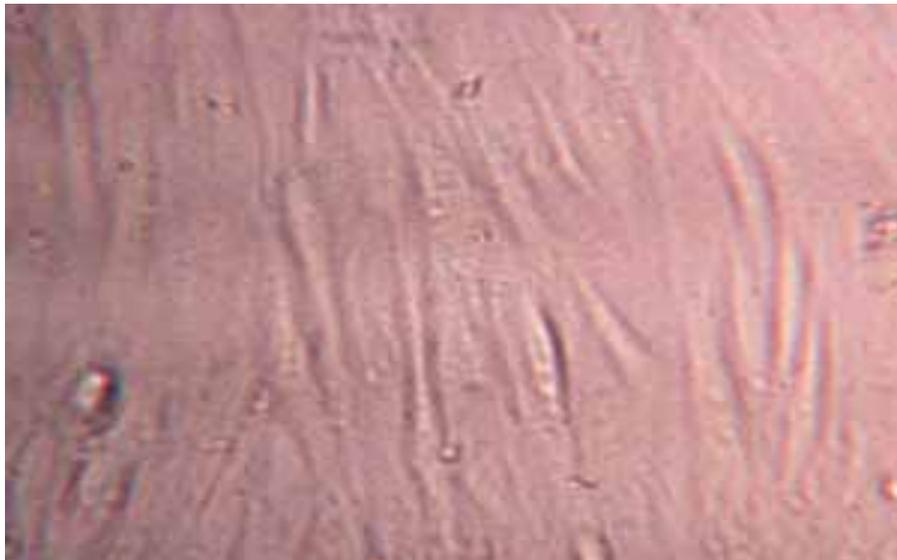


图 6 - 2 GEF 饲养层 100 ×
Plate 6—2 The feeder layers of GEF

2.4 胚胎的准备

2.4.1 体内受精囊胚

选取健康性成熟的母羊，放阴道栓 9d 采用四天八次递减注射 FSH (9~11 mg) 法进行超排处理，在第 6 次和第 7 次肌肉注射 FSH 的同时，肌肉注射氯前列烯醇各 2 支 (0.2 mg/支)，在第 8 次注射 FSH 的同时去栓。去栓后观察发情，并及时配种。在第一次配种后 6~7d，手术法冲胚，此时，绝大多数为囊胚。

2.4.2 体外受精囊胚

体外受精囊胚来自前部分试验所得囊胚。

2.4.3 孤雌激活胚

成熟培养见第二章。用离子霉素 (ionomycin) 联合 6-DMAP (6-dimethylaminopurine, 6-2-甲基-氨基嘌呤, 6-DMAP) 激活山羊成熟卵母细胞。即在含 5uM 离子霉素的 M199 液激活 4 min，然后在含 2 mM 6-DMAP 溶液中培养 2h。用培养液洗三次，于 CR1 液（同第四章）中培养 9d 后收集孤雌激活囊胚。

2.5 山羊 ES 细胞的分离培养

将不同来源（体内受精胚、体外受精胚和孤雌激活胚）的山羊囊胚培养在提前一天制备好的 MEF 或 GEF 饲养层上。添加相应的山羊 ES 细胞培养液。在 37℃、5% CO₂、饱和湿度的条件下培养。96h 后观察胚胎贴壁情况，每 48h 更换培养液。

2.5.1 ICM 的初次传代培养

ICM 增殖后，实体显微镜下挑取形态典型的 ICM 集落，0.25% 胰酶 + 0.04% EDTA 消化液消化 3~5 min，再转入 ES 细胞培养液中进行剥离，同时用孔径适当的吸尿管吹打成单细胞或小细胞团块，转入新的 MEF 或 GEF 饲养层上培养。

2.5.2 山羊 ES 细胞的继代培养

初次传代后 2~3d 将出现小的 ES 细胞集落，待 ES 细胞集落充分增殖而不出现分化时 (4~6d) 重新离散，转入新鲜饲养层上。经数次分离纯化后，ES 细胞逐渐扩增，当扩增到一定数量时由四孔板转移到 3.5 cm 的培养皿中培养。以后按常规稳定传代方法每隔 4~6d 传代一次。

2.6 ES 细胞鉴定

2.6.1 形态学鉴定

倒置显微镜下观察山羊 ES 细胞集落的形态特征及生长行为。

2.6.2 AKP 染色

吸出培养液，DPBS 清洗 3 次，4%戊二醛室温固定 15 min，DPBS 清洗 3 次，加入 AKP 液，作用 15~30 min。DPBS 冲洗 3 次，倒置显微镜下观察。

2.6.3 核型分析

选取处于旺盛生长期的山羊 ES 细胞，吸去培养液，加入浓度为 0.2 $\mu\text{g/ml}$ 秋水仙素继续培养 3h。消化，离心，收集细胞。顺管壁逐滴加入 1 ml 预温 37 $^{\circ}\text{C}$ 的 0.075 mol/L KCl，用吸管轻吹混匀，37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴作用 25 min。再缓慢加入固定液 (甲醇与冰醋酸 3:1) 8 ml，用吸管轻吹混匀，室温下作用 15 min，1000 rpm 离心 5 min，弃上清。重复固定一次。加入 0.5 ml 固定液，轻轻吹打混匀制成悬液。距离载玻片 (一般要求预先 -10 $^{\circ}\text{C}$ 冰冻) 1cm 高度，向玻片滴 2 或 3 滴细胞悬液，自然干燥。用吉姆萨染色液室温下作用 10~20 min，自来水冲洗载玻片背面。二甲苯透明 3 次，中性树胶封片。在倒置显微镜，观察染色体分布情况。

2.6.4 体外分化

选取 ES 细胞集落，消化离散成单个或几个细胞，接种在无饲养层的经明胶处理过的六孔板上，加入无 LIF 的 ES 细胞培养液培养，定时观察。

3 结果

3.1 山羊 ICM 的生长行为

山羊囊胚尽管来源不同，但均在 48~72h 内孵化脱去透明带 (图 6-3)。孵化胚体积约为初始囊胚的 2 倍左右，胚胎孵化后 48~72h 贴壁，起初先由一点与饲养层接触，然后，接触面积逐渐增大呈半圆形，最后，滋养层细胞全部贴在饲养层上，囊胚腔消失，ICM 隆起在中央。与周围饲养层界限清晰，但并不推开饲养层细胞生长。滋养层细胞增殖向四周蔓延生长，同时 ICM 快速增殖向上垂直生长，细胞数量多，结构紧密，边缘较为整齐 (图 6-4)。有时可见滋养层细胞进一步生长，而 ICM 增殖不明显，平坦，细胞数量少，细胞间松散，逐渐分化。贴壁快的胚胎 (60~96h) 较贴壁慢的胚胎 (108~120h) 形成 ICM 集落形态典型。

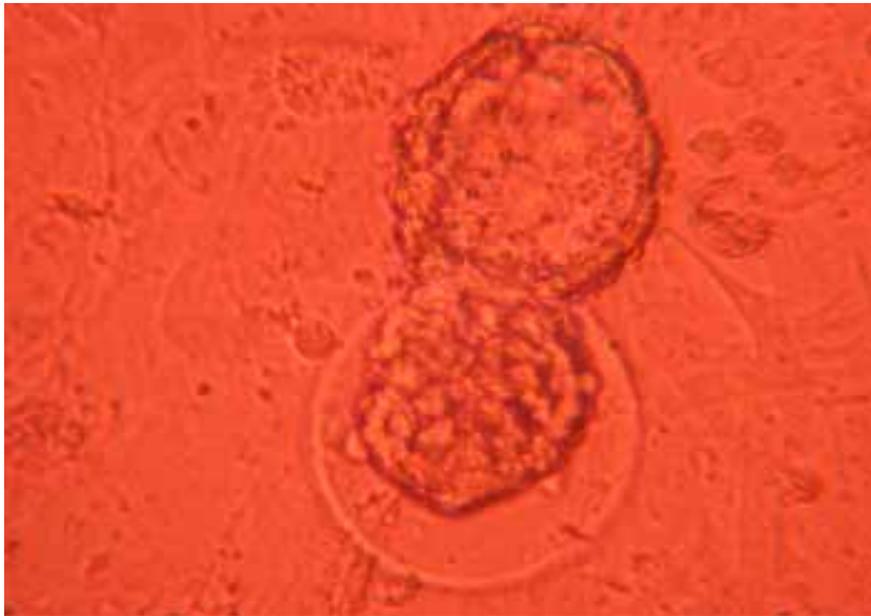


图 6 - 3 山羊孵化囊胚贴在 MEF 饲养层上 100 ×

Plate 6—3 The hatching blastocyst attaching on the MEF feeder layers inn goats

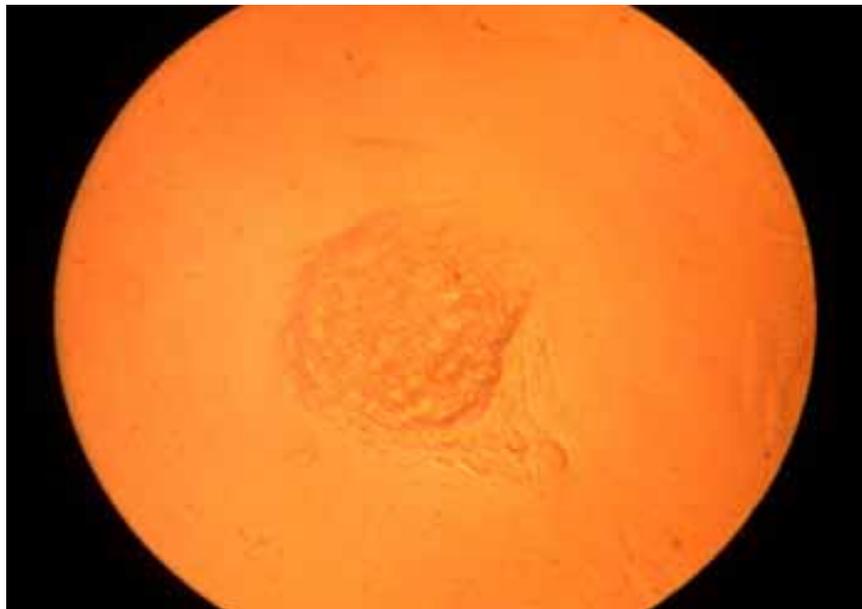


图 6 - 4 原代山羊 ES 细胞集落 100 ×

Plate 6—4 The ES cell clusters of primary generation in goat

3.2 不同来源的胚胎对山羊 ES 细胞分离培养的影响

用于分离 ES 细胞的胚胎分别来源于体内受精、体外受精囊胚和孤雌激活胚。结果表明，体内受精胚与体外受精胚在胚胎贴壁率 (85.7%、81.1%) 与 ICM 集落形成率 (58.9%、54.1%) 上差异不显著，但均明显优于孤雌激活胚；在 ES 细胞传代上，体内受精胚最适合山羊 ES 细胞的分离与培养，体外受精胚次之，孤雌激活胚最差(表 6-1)。

表 6 - 1 不同来源的胚胎对山羊 ES 细胞分离与培养的影响

Table 6 - 1 Effect of different embryo resources on the isolation and culture of ES cells in goats

囊胚 来源 Embryo resources	胚胎贴壁 率(%)Embryo attaching (%)	ICM 集落形 成 (%) ICM cluster (%)	1 代(%)	2 代(%)	3 代(%)	4 代(%)	5 代(%)	6 代(%)
			G ₁ (%)	G ₂ (%)	G ₃ (%)	G ₄ (%)	G ₅ (%)	G ₆ (%)
体内受精 (In vivo)	85.7 ^a 48/56	58.9 ^a 33/56	35.7 ^a 20/56	25.0 ^a 14/56	16.1 ^a 9/56	10.7 ^a 6/56	3.6 2/56	1.8 1/56
体外受精 (In vitro)	81.1 ^a 30/37	54.1 ^a 20/37	21.6 ^b 8/37	13.5 ^b 5/37	8.1 ^b 3/37	2.7 ^b 1/37		
孤雌激活 (Activated)	40.0 ^c (10/25)	32.0 ^b (8/25)	8.0 ^c (2/25)					

上标 a, b, c 为差异显著即 (P<0.05)

a, b, c different superscripts within columns are significantly different (P<0.05)

3.3 不同饲养层对山羊 ES 细胞分离与培养的影响

对比 MEF 和 GEF 两种饲养层细胞对分离培养山羊 ES 细胞的影响 (表 6-2)。结果表明，MEF 与 GEF 在胚胎贴壁率上差异不显著 (75.6%、73.7%)，在 ICM 集落形成率 (46.7%、26.3%) 与传代数上，MEF 饲养层更适合山羊 ES 细胞的分离培养 (图 6-5、图 6-6)。

表 6 - 2 不同饲养层对山羊 ES 细胞分离与培养的影响

Table 6 - 2 Effects of different types of trophoblast on the isolation and culture of ES cells in goat

饲养层种类 Trophoblasts	胚胎贴壁率 (%) Attaching	ICM 集落形 成率(%) Cluster	1 代克隆率 (%) G ₁	2 代克隆 率(%) G ₂	3 代克隆 率(%) G ₃	4 代克隆 率(%) G ₄
MEF	75.6 ^a (34/45)	46.7 ^a (21/45)	24.4 ^a (11/45)	11.1 ^a (5/45)	4.4 (2/45)	2.2 (1/45)
GEF	73.7 ^a (14/19)	26.3 ^b (5/19)	10.5 ^b (2/19)	5.2 ^b (1/19)		

* 实验重复 3 次，培养液为 B 液。

With three replications; Cultured in B medium

上标 a, b, c 为差异显著即 (P<0.05)

a, b, c different superscripts within columns are significantly different (P<0.05)

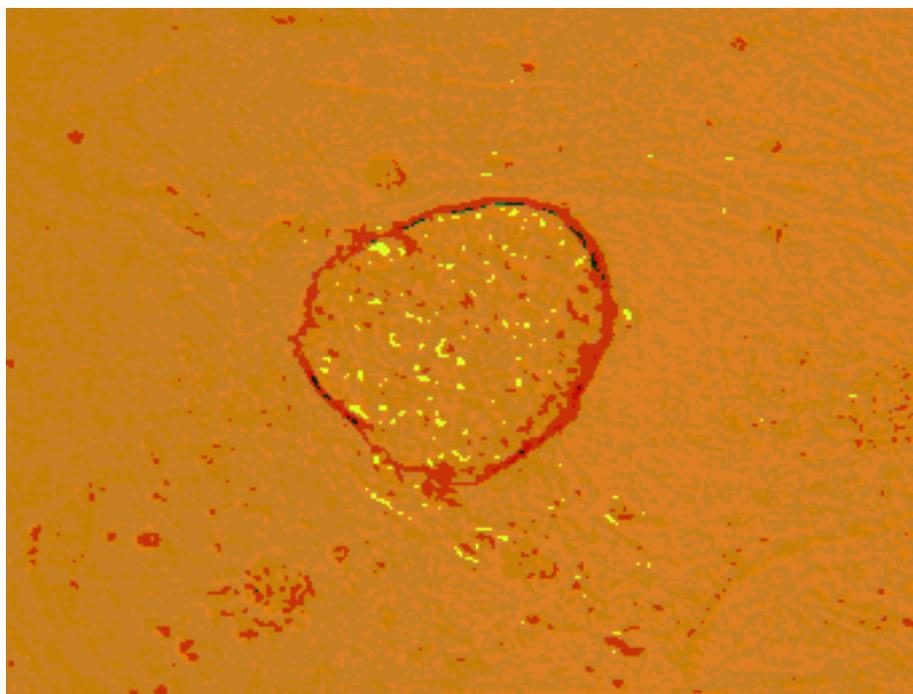


图 6 - 5 二代山羊 ES 细胞集落 100 ×

Plate 6-5 The ES cell clusters of the second generation in goats

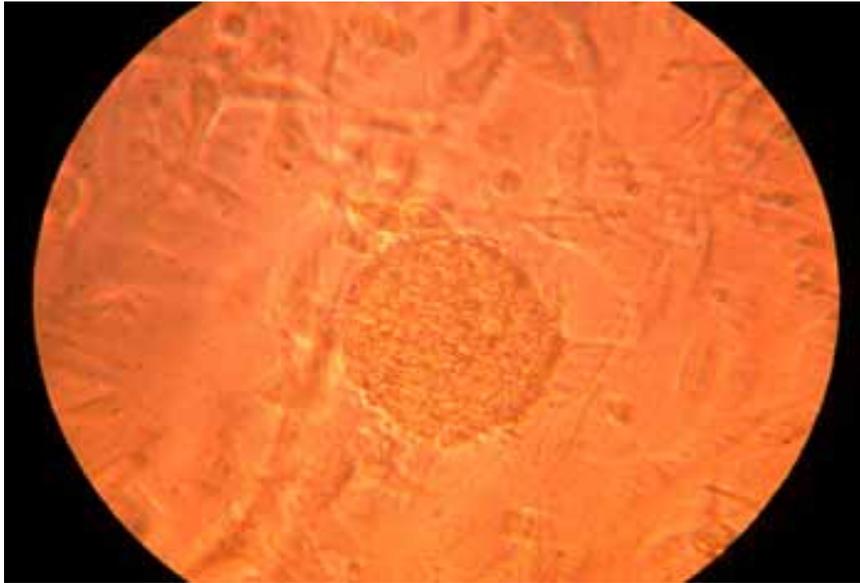


图 6 - 6 四代山羊 ES 细胞集落 100 ×

Plate 6—6 The ES cell clusters of the forth generation in goats

3.4 不同种类血清对山羊 ES 细胞分离培养的影响

比较 FCS、NCS (新生牛血清) 两种不同类型血清对山羊 ES 细胞分离培养的影响(表 6—3)。结果表明, 在胚胎贴壁率 (66.7%、42.7%)、ICM 集落形成率 (53.3%、25.0%) 以及 ES 细胞传代上, FCS 较 NCS 更有利于山羊 ES 细胞的分离与传代 ($P<0.05$)。

表 6 - 3 不同种类的血清对山羊 ES 细胞分离与培养的影响

Table 6 - 3 Effect on of different types of serum on the isolation and culture of ES cells in goats

血清种类 Types of the serum	胚胎贴壁率 Attaching rate (%)	ICM 集落形成率 ICM colony forming rate (%)	1 代克隆率 Colony rate of generation 1 (%)	2 代克隆率 Colony rate of generation 2 (%)
FCS	66.7 ^a (10/15)	53.3 ^a (8/15)	13.3 (2/15)	6.7 (1/15)
NCS	41.7 ^b (5/12)	25.0 ^b (3/12)	0	0

*实验重复 3 次, 培养液为 B 液。饲养层为 MEF

* ES culture medium is B solution. Feeder is MEF.

上标 a、b 为差异显著即 ($P<0.05$)

^{a, b} different superscripts within columns are significantly different ($P<0.05$)

3.5 不同培养液对山羊 ES 细胞分离培养的影响

对比 A、B、C 三种不同培养液对山羊 ES 细胞分离培养的影响。表明，B 液与 C 液在胚胎贴壁率(80.0%、87.5%)与 ICM 集落形成率(56.0%、56.3%)上无明显差异(表 6-4)，但均显著优于 A 液；A 液不利于山羊 ES 细胞的分离与培养，添加 LIF 的 B 液在 ES 细胞传代数上较 A 液有明显提高，而添加 LIF 及 IGF-1 的 C 液在 ES 细胞传代数上(6 代)明显优于 B 液(4 代)，极显著优于 A 液(2 代)，并且，在 ES 细胞形态及增殖速度上明显优于 A 和 B 液。

表 6 - 4 不同培养液对山羊 ES 细胞分离与培养的影响

Table 6 - 4 Effects of different types of medium on the isolation and culture of ES cells in goats

培养液 Media	胚胎贴壁 率 (%) Attaching	ICM 集 落形成 率(%) Cluster	1 代克 隆率 (%) G ₁	2 代克 隆率 (%) G ₂	3 代克 隆率 (%) G ₃	4 代克 隆率 (%) G ₄	5 代克 隆率 (%) G ₅	6 代克 隆率 (%) G ₆
A 液	66.7 ^b (16/24)	25.0 ^b (6/24)	7.1 ^c (2/28)	3.6 ^c (1/28)				
B 液	80.0 ^a (20/25)	56.0 ^a (14/25)	36.0 ^b (9/25)	24.0 ^b (6/25)	16.0 ^b (4/25)	8.0 ^b (2/25)		
C 液	87.5 ^a (28/32)	56.3 ^a (18/32)	43.8 ^a (14/32)	31.3 ^a (10/32)	25.0 ^a (8/32)	12.5 ^a (4/32)	6.3 (2/32)	4.1 (1/32)

*实验重复 3 次，培养液为 B 液。饲养层为 MEF

* ES culture medium is B solution. Feeder is MEF.

上标 a、b 为差异显著即 (P<0.05)

^{a, b, c} different superscripts within columns are significantly different(P<0.05)

3.6 山羊 ES 细胞的鉴定

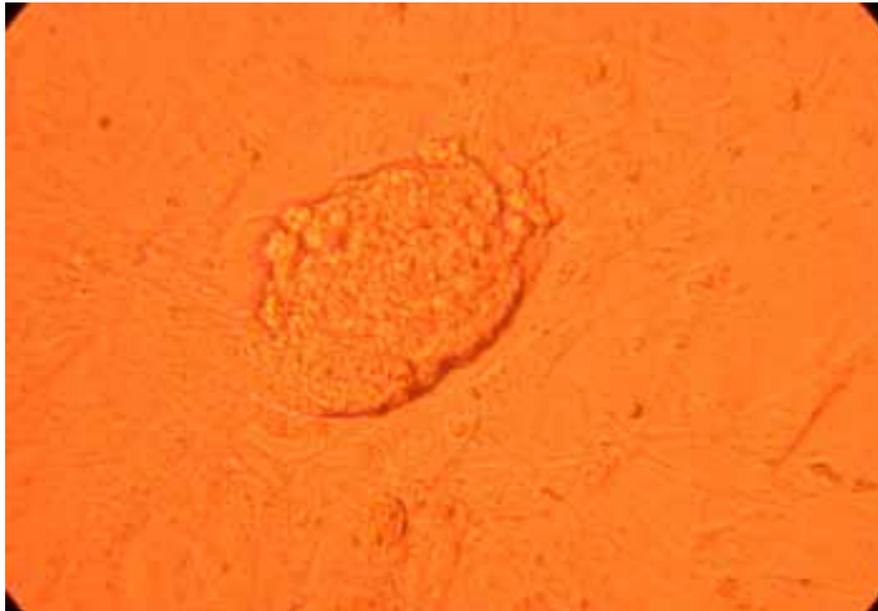


图 6 - 7 六代山羊 ES 细胞集落 100 ×

Plate 6-7 The ES cell clusters of the sixth generation in goats

3.6.1 形态学鉴定

山羊 ES 细胞形态典型，呈克隆状生长，细胞紧密地聚集在一起，形似鸟巢，细胞界限不清，边缘整齐，折光性强。6 代山羊 ES 细胞集落形成情况见图 6-7。

3.6.2 AKP 染色

AKP 染色呈阳性，集落呈红棕或黑色，成纤维细胞呈淡黄或无色(图 6-8、, 图 6-9)。

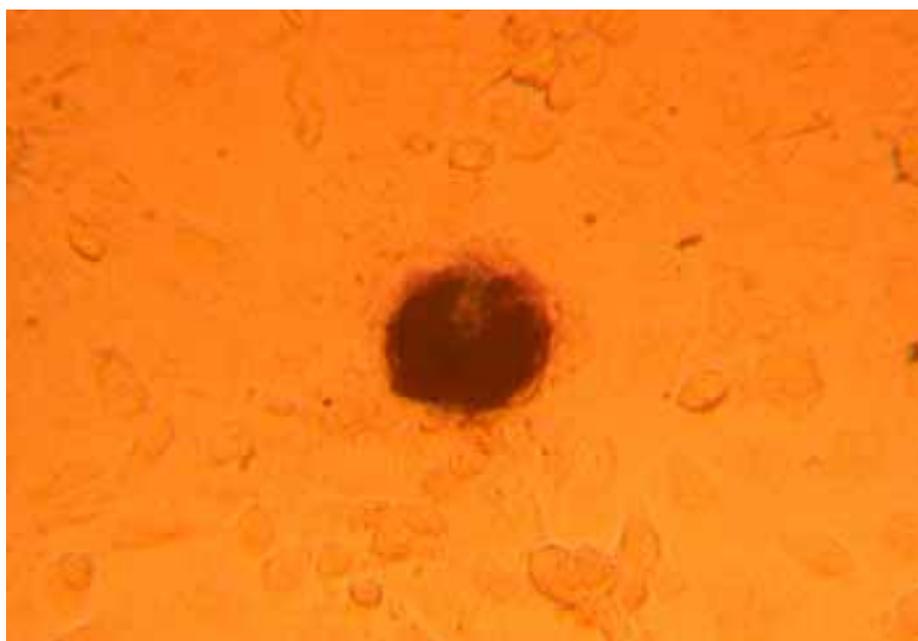


图 6 - 8 三代山羊 ES 细胞集落，AKP 染色阳性 100 ×

Plate 6-8 The ES cell clusters of the third generation in goats(alkaline phosphatase activity)

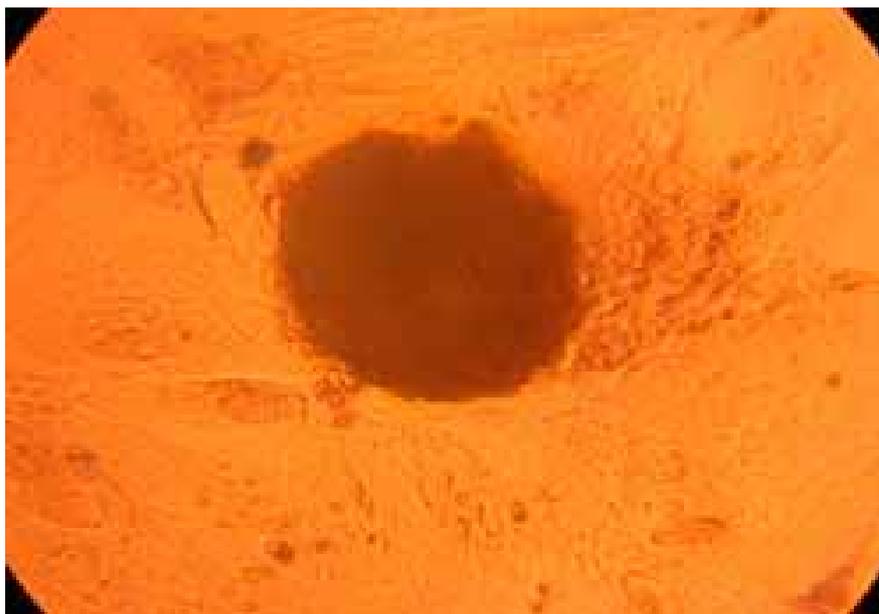


图 6 - 9 五代山羊 ES 细胞集落, AKP 染色阳性 100 ×

Plate 6—9 The ES cell clusters of the fifth generation in goats(alkaline phosphatase activity)

3.6.3 核型分析

对分离第 4 代山羊 ES 细胞核型分析, 为正常的二倍体核型, $2n=60$ 条 (图 6—10)。

3.6.4 体外分化

在传代过程中, 观察到山羊 ES 细胞可自发分化为神经样细胞 (图 6—11)、上皮样细胞 (图 6—12) 和成纤维样细胞 (图 6—13)。



图 6 - 10 四代山羊 ES 细胞核型 400 ×

Plate 6—10 The nuclear types of ES cells of the fourth fifth generation in goats

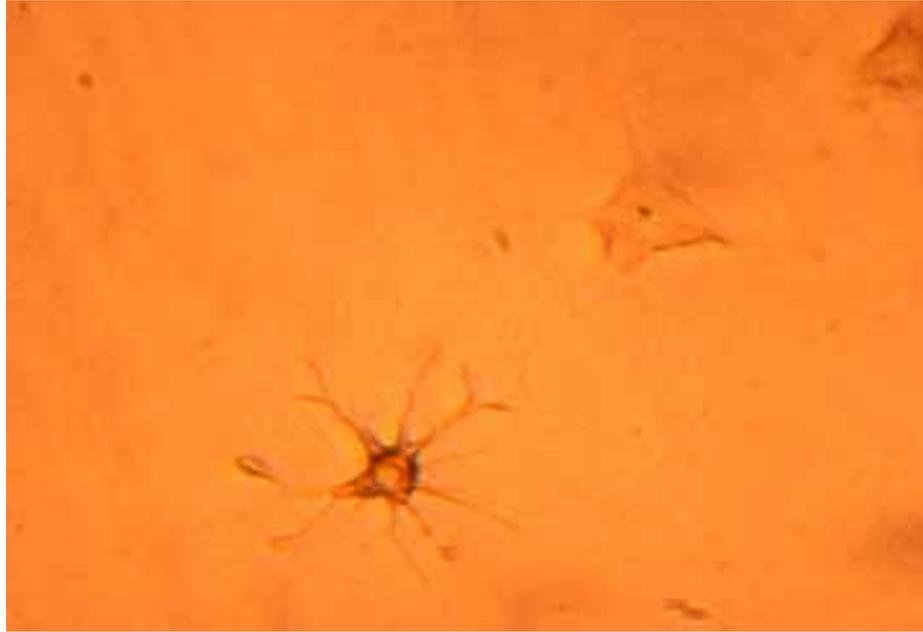


图 6 - 11 山羊 ES 细胞分化为神经样细胞 100 ×

Plate 6—11 The like-epithelial cell differentiated from ES cells in goats

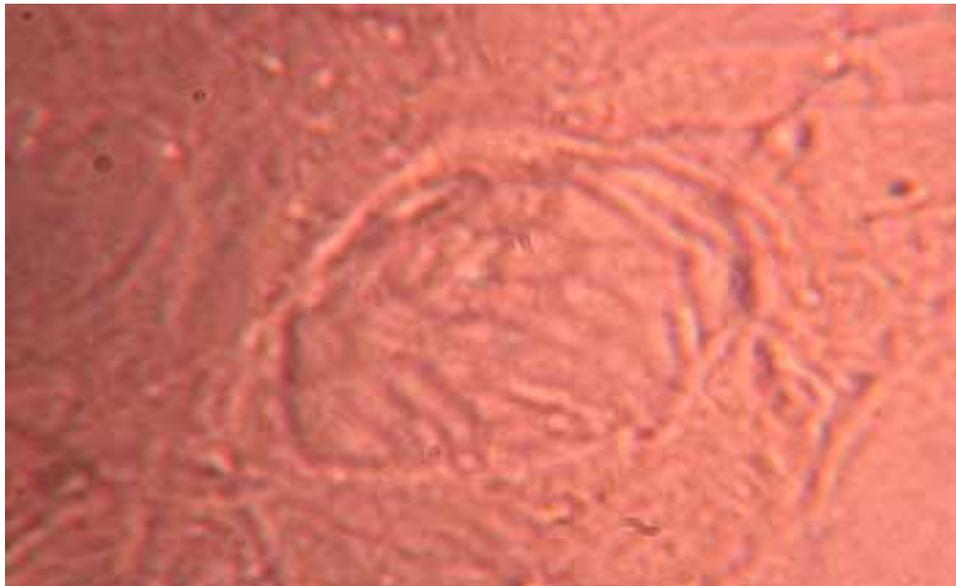


图 6 - 12 山羊 ES 细胞分化上皮样细胞 200 ×

Plate 6—12 The like-nurse cell differentiated from ES cells in goats

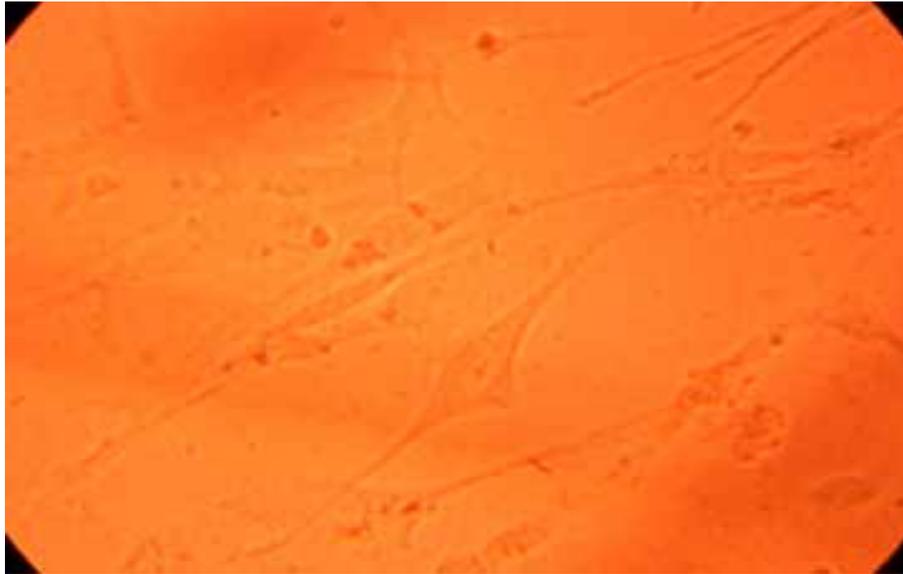


图 6 - 13 山羊 ES 细胞分化成纤维样细胞 100 ×

Plate 6-13 The like-fibroblast cell differentiated from ES cells in goats

4 讨论

4.1 胚胎来源及质量对山羊 ES 细胞分离培养的影响

胚胎来源与 ES 细胞分离培养效果有直接关系。目前，人工模仿精子获能、卵母细胞成熟及母体子宫体内的环境还不是十分完善，可能会引起胚胎不正常的发育。资料显示，不成熟的体外培养体系是妨碍猪体外受精囊胚正常产仔的主要原因。核移植、体外受精与孤雌激活囊胚内细胞数目（分别为 66，66 和 49 个）比体内发育囊胚（200~300 个）明显低，这也是核移植与体外受精胚胎妊娠率低的原因之一^[370]。刘红林等（1998）发现从小鼠孤雌激活囊胚也很难分离到 ES 细胞，主要是基因组印记的缘故^[275]。本研究分别用体内受精、体外受精囊胚和孤雌激活胚三种不同来源胚胎为材料分离山羊 ES 细胞，分析不同来源的胚胎对山羊 ES 细胞分离传代的影响。体内受精胚与体外受精胚在胚胎贴壁率（85.7%、81.1%）与 ICM 集落形成率（58.9%、54.1%）上差异不显著（ $P>0.05$ ），但均明显优于孤雌激活胚（胚胎贴壁率和 ICM 集落形成率分别为 40.0%、32.0%）；在 ES 细胞传代上，体内受精胚（传 6 代）最好，体外受精胚（传 4 代）次之，孤雌激活胚最差（传 1 代）。结果表明，体内受精胚最适合山羊 ES 细胞的分离与培养，同时也说明胚胎的质量是影响 ES 细胞分离培养的重要因素。

4.2 饲养层对山羊 ES 细胞分离培养的影响

尽管人们还不能完全搞清楚饲养层分泌的化学活性物质成分，但饲养层对分离培养建立 ES 细胞系具有重要作用。目前，不同种动物对饲养层细胞有特殊要求，不同种类饲养层细胞对胚胎的作用也不同。Piedrahita 等（1990）对不同类型羊、猪、小鼠胚胎在不同饲养

层细胞上的生长行为进行了系统比较,发现绵羊全胚或分离的 ICM 在 STO 饲养层上不扩展,而在同源胎儿成纤维细胞上可扩展,但不能形成 ES 细胞克隆;猪全胚或分离的 ICM 在 BRL-CM (大鼠肝细胞条件培养液)、PEF (猪上皮成纤维细胞)、PH3A (PH3A 细胞系)、PUE (猪子宫上皮细胞系) 等饲养层上不能附着生长,只有 STO 或 STO+BRL-CM 上可附着并增殖,转移至饲养层上形成类 ES 细胞^[277]。李松等 (2002) 表明,以同源的胎儿成纤维细胞作饲养层有利于 ES 细胞的分离与培养,因为同源的胎儿成纤维细胞提供了 ES 细胞增殖所需的细胞因子^[371]。饲养层细胞质量的不确定,对维持胚胎干细胞的稳定传代产生很大的冲击。同时,饲养层细胞的种类、细胞生长的旺盛程度、细胞代数以及丝裂霉素-C 处理的时间和程度等都同饲养层的好坏密切相关,影响到饲养层细胞的分泌。本研究比较 MEF 和 GEF 两种饲养层细胞对分离培养山羊 ES 细胞的影响。结果表明,MEF 与 GEF 在胚胎贴壁率上差异不显著 (75.6%、73.7%),在 ICM 集落形成率 (46.7%、26.3%)与传代数上,MEF 组 (传 4 代) 显著优于 GEF 组 (传 2 代)。表明 MEF 饲养层更适合山羊 ES 细胞的分离培养。

4.3 血清对山羊 ES 细胞分离培养的影响

血清包含各种生长因子、微量元素、激素、维生素和转铁蛋白等,有利于细胞的附着,且能中和有毒物质的毒性,使细胞不受伤害^[124]。旭日干等 (1990) 报道,胎牛血清和新生牛血清效果相似,而发情牛血清可更有效地提高体外受精胚的发育率^[34]。ES 细胞分离培养一般是添加 FCS,而冻存时加 NCS。施渭康等 (2000) 在培养液添加 10%小牛血清成功将 ES 细胞诱导分化为软骨细胞^[372]。本研究比较 FCS、NCS 两种不同类型血清对山羊 ES 细胞分离培养的影响。结果表明,在胚胎贴壁率 (66.7%、42.7%)、ICM 集落形成率 (53.3%、25.0%) 上,FCS 均显著优于 NCS;传代上 FCS 组传 2 代,而 NCS 组没有传代。以上分析说明,在胚胎贴壁率、ICM 集落形成率以及 ES 细胞传代上 FCS 较 NCS 更有利于山羊 ES 细胞的分离与培养。

4.4 细胞因子对山羊 ES 细胞分离培养的影响

LIF 是目前研究最多、应用最广泛的一种 ES 细胞分化抑制因子。根据 LIF 前体蛋白 N 端信号肽起始若干个信号残基的不同,可将其分为分泌型 (D 型) 和基质型 (M 型) 两种。D 型可分泌到细胞外液中,是可溶的;M 型则锚定在细胞外基质上。Conquet 等 (1992) 发现,只需饲养层细胞的细胞外基质即可抑制 ES 细胞分化,并证实这是由于其胞外基质存在大量锚定的 LIF^[373]。ES 细胞中微量表达的 LIF 也主要为 M 型。M 型 LIF 的表达在 ES 细胞分化前后都较恒定;而 D 型 LIF 则在 ES 细胞体外分化时表达量才显著提高。目前,对小鼠 ES 细胞来说,LIF 起着抑制分化的作用已成定论^[262, 374]。山羊^[15]、绵羊^[296]、猪^[374]、恒河猴^[375]以及人^[258]ES 细胞分离培养也需要添加 LIF 来抑制其分化和促进其增殖。而牛 ES

细胞分离与培养无需添加 LIF。IGF-I 和胰岛素在结构和功能上很相近，在 ES 细胞培养中二者可互换，可促进胚胎细胞 DNA 和蛋白质的合成，增加胚胎细胞数，调节囊胚腔的出现和胚胎自透明带孵出^[376]。将 IGF-I 或胰岛素加入培养液中，可促进受精卵卵裂，增加卵裂胚的紧密度和囊胚形成率，促进滋养层与内细胞团细胞的蛋白质合成，从而促进滋养层和内细胞团细胞的分裂增殖。外源性生长因子的添加与否对附植前胚胎的生长并不是至关重要的，只是生长因子可能对胚胎保持最佳发育速度有一定作用^[377]。本研究表明，A 液组，不添加任何细胞因子，ES 细胞分离培养效率很低，胚胎贴壁率和 ICM 集落形成率分别为 66.7%、25.0%；B 液组，添加了细胞因子 LIF，对山羊 ES 细胞的分离培养有促进作用，胚胎贴壁率和 ICM 集落形成率分别 80.0%、56.0%，明显优于 A 液组；C 液组，是 LIF 与 IGF-I 联合作用，其胚胎贴壁率和 ICM 集落形成率（87.5%、56.3%）明显优于 A 液组，但与 B 液组相比，差异不显著；在 ES 细胞传代上，C 液组效果最佳（传 6 代），B 液组次之（传 4 代），A 液组最差（传 2 代）。以上分析表明，不添加任何生长因子，ES 细胞分离培养效率很低，添加 LIF 对山羊 ES 细胞的分离培养有促进作用，LIF 与 IGF-I 联合作用，效果更为突出。见表 6-4。

4.5 山羊 ES 细胞的鉴定

山羊 ES 细胞集落形态与小鼠 ES 细胞相似，集落边缘整齐，隆起，细胞间界限不清，折光性强。但形态学方面的鉴定只能是一个初步的鉴定手段，进一步鉴定需要对其细胞表面标志物进行检测。AKP 染色通常作为 ES 细胞鉴定的一种常用的染色方法，山羊 ES 细胞 AKP 染色为阳性^[298]。本试验对第 3 代及第 5 代的山羊 ES 细胞进行染色，发现 AKP 染色呈阳性。核型分析也是检测 ES 细胞的一个标准，如果 ES 细胞的核型不正常，则不能进行遗传操作和临床应用，这样的 ES 细胞系也不能称为真正的 ES 细胞系。小鼠的 ES 细胞在体外培养的过程中常常会出现染色体异常，这可能是由于不正常的传代培养方法有关。本试验对第四代的山羊 ES 细胞进行核型分析，含有 60 条染色体，核型正常。体外分化试验通常是检测 ES 细胞多能性的一个手段^[378]，如体外分化可形成含有 3 个组织胚层的类胚体，可对其进行诱导分化为机体任何类型的细胞。本试验对山羊 ES 细胞进行自发分化可形成神经样细胞、上皮样细胞、成纤维样细胞。

5 结论

通过对 ES 细胞分离培养影响因素如胚胎来源、饲养层、血清以及细胞因子等的试验研究表明，体内受精胚胎、MEF 饲养层、添加 FCS、细胞因子 LIF 与 IGF-I 联合使用更适合于山羊 ES 细胞的分离培养。

结 论

1 在羊卵母细胞体外成熟培养中，选用胞质均一致密，外围至少有 3 层以上卵丘细胞包裹，而且包裹致密的 A 级卵母细胞，添加浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 E_2 、5 μM 的 $\beta\text{-ME}$ ，成熟培养 27h 显著提高卵母细胞体外培养的成熟率。

2 促成熟激素使用国产促绒激素完全可以代替进口的 FSH 和 LH 用于羊卵母细胞体外成熟培养，在相同效果的前提下大大降低成本。

3 精子获能中，肝素效果比较稳定。Percoll 法处理精子卵裂率要显著高于上浮法，但是囊胚率和囊胚细胞数并没有提高。上浮法的精子镜检活力要好于 Percoll 法分离的精子。但是，以上分析的不同获能物和精子不同分离方法，总体受精率、发育率还很低，所以在羊精子获能中，还需要大量的试验研究。

4 胚胎体外培养时，颗粒细胞和输卵管细胞共培养并没有发育差异，说明共培养细胞类型对胚胎发育影响差异不大，而显著优于无共培养系的发育率。进一步说明，只要使用共培养就能够很好地克服羊胚胎 8~16 - 细胞阻滞。

5 在胚胎早期卵裂时期，添加 BSA 的卵裂率要显著高于添加 FCS。而在发育后期，即 48h 后由 BSA 换为添加 FCS 促进胚胎向囊胚发育，即囊胚率 (34.7%) 显著高于单独使用 BSA 组 (23.1%) 和 FCS 组 (20.1%)。可见，在胚胎发育早期，卵母细胞本身储备的营养物质与 BSA 就完全能够满足发育的需要；到后期，胚胎细胞数要快速分裂，还需含 FCS 的共培养系统提供营养。

6 在羊胚胎培养中，基础培养液还是选用配制简单的 SOF (CR1 也可使用)，添加 BSA/FCS 才能取得理想的效果。

7 体内胚胎和体外胚胎超微结构的对比分析表明，羊体外胚胎质量要比体内发育胚差。包含有大量脂滴、畸形线粒体以及空泡化严重、细胞间隙连接较少且松散、核质比下降等。所以，要获得高质量的胚胎，目前建立的培养体系还需进一步完善。

8. 通过对羊 ES 细胞分离培养影响因素如：胚胎来源、饲养层、血清以及细胞因子等的实验研究表明，体内受精胚胎、MEF 饲养层、添加 FCS、细胞因子 LIF 与 IGF-1 联合使用更适合于羊 ES 细胞的分离培养。

参 考 文 献

- [1] Pincus G et al. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro J Exp Med, 1935, 62 : 665–670
- [2] 邵华等,“两步法”体外培养山羊卵母细胞的初步研究,内蒙古大学学报,2002,33:546–551
- [3] 陈大元等,哺乳动物体外精,受精生物学,科学出版社2000,447pp
- [4] 张忠诚等,体外受精,家畜繁殖学,中国农业出版社,2003,311pp
- [5] Chang M. C. Fertilization of rabbit ova in vitro. Nature, 1959, 184 : 466–467
- [6] Zamboni et al Fine morphology of human oocyte maturation in vitro. Biol Reprod, 1972, 7 : 425
- [7] Nicosia S V et al. Rabbit ovarian follicles. Isolation technique and characterization at different stages of development. Biol Reprod, 1975, 13 : 423–447
- [8] Gandolfi F, et al. An in vitro approach to the growth of ovarian follicles from primary to antral stage. In: Proceedings of 11th international congress on animal reproduction and artificial insemination. Dublin, 1988 : 328
- [9] Roy S K et al. Hormonal requirements for the growth and differentiation of hamster preantral follicles in long-term culture. Reprod Fert, 1989, 87 : 103–114
- [10] Eppig J J et al. 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 : 268–276
- [11] Kishimoto T et al. Regulation of metaphase by a maturation-promoting factor. Dev Growth Differ, 1988, 30 : 105–110
- [12] Tornell J et al. Effect of cyclic AMP on the isolate human oocyte-cumulus complex. Hum Reprod, 1993, 8 : 737–740
- [13] Pal S K et al. Expression and potential function of the c-mos proto-oncogene in human egg. Fertil Steril, 1994, 61 : 496–500
- [14] Eppig J J et al development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. Biol Reprod, 1996, 54 : 197–207
- [15] Edwards . maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus, monkey and human ovarian oocytes. Nature, 1965, 208 : 349–351
- [16] Crosby I M. et al. Follicle cell regulation of protein synthesis developmental competence in sheep oocytes Reprod Fertil, 1981, 62 : 575–582
- [17] J K. et al. Effect of hormone of pre-treatment of prepubertal sheep on the production and developmental capacity of oocytes in vitro and in vivo. Reprod Fertil Dev, 1997, 9 : 625–631
- [18] Izquierdo, D et al. Effect of in vitro and in vivo culture on embryo development from prepubertal goat IVM–IVF oocytes. Theriogenology, 2002, 57 : 1431–1441
- [19] Ptak G et al. Studies on the developmental capability of prepubertal oocytes Biol Reprod, 1999, 61 : 1568–1574
- [20] Earl C R et al. Ovarian stimulation protocols for oocyte collection and in vitro embryo production from 8 to 9 week old lambs. Theriogenology, 1995, 43 : 203–208
- [21] O'Brien J K. et al. Developmental capacity, energy metabolism and ultrastructure of mature oocytes from prepubertal and adult sheep. Reprod Fertil Dev, 1996, 8 : 1029–1037
- [22] Mogas T et al. Developmental capacity of in vitro matured and fertilized oocytes from prepubertal and adult goats. Theriogenology, 1997, 47 : 1189–1203

- [23]Armstrong D T.et al. Advance in production of embryos in vitro from juvenile and prepubertal oocytes from the calf and lamb *Reprod Fertil Dev*, 1997, 9 : 333–339
- [24]Baldassarre H et al. Technique for efficient recovery of sheep oocytes by laparoscopic folliculocentesis. *Anim Reprod Sci*, 1994, 35 : 145–150
- [25]Baldassarre H et al. In vitro production of sheep embryos using laparoscopic folliculocentesis:alternative gonadotrophin treatments for stimulation of oocyte donors *Theriogenology*, 1996, 45 : 707–717
- [26]Graff K J. et al. Transvaginal ultrasound–guided oocyte retrieval following FSH stimulation of domestic goats *Theriogenology*, 1999, 51 : 1109–1119
- [27]Baldassarre H. Ovum pick–up followed by in vitro production of embryos in sheep and cattles In : *Proc 4th Swedish Intern Progr Anim Reprod Biotech Latin America Belem Para Brazil*, 1998 : 62–70
- [28]Pawshe C H. et al. A comparison of three methods of recovery of goat oocytes for in vitro maturation and fertilization. *Theriogenology*, 1994, 42 : 117–125
- [29]Smedt V et al. Morphological and functional changes accompanying the acquisition of meiotic competence in ovarian goat oocyte *J Exp Zoology*, 1994, 269 : 128–139
- [30]Pawshe C H. et al. Comparison of various maturation treatments on in vitro maturation of goat oocytes and their early embryonic development and cell numbers. *Theriogenology*, 1996, 46 : 971–981
- [31]Smedt V D et al. In vitro maturation and fertilization of goat oocytes. *Theriogenology*, 1992, 37 : 1049–1060
- [32]Crozet N et al. Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation. *Fertilization and culture in vitro J Reprod Fertil*1995, 103 : 293–298
- [33]徐照学等, 山羊卵泡卵母细胞体外受精及受精卵的体外发育, *中国兽医学报*, 1998, 18 (5): 506–509
- [34]旭日干, 山羊、绵羊卵子的体外受精, 内蒙古大学出版社, 1990, 300pp
- [35]Qian J F,Zhang Y.Experiment on in vitro capacitation of ejaculated sperm and in vitro fertilization in the dairy goat.*Theriogenology*, 1991, 1 : 35
- [36]滨野光市等,体外受精——体外成熟卵胞内卵子的体外受精, *家畜繁殖学杂志*, 1985, 31 (5): 32–39
- [37]刘灵等, 山羊卵巢卵母细胞的体外成熟, *西北农业大学学报*, 1992, suppl: 107–110
- [38]郝志明, 小鼠、山羊卵泡卵母细胞的体外成熟培养和进一步冷冻研究, 西北农业大学硕士论文, 1989
- [39]周欢敏等, 生长因子对山羊无腔卵泡卵母细胞体外生长的影响, *畜牧兽医学报*, 2001, 32 (1): 23–27
- [40]张涌等, 山羊小腔卵泡卵母细胞的体外成熟和体外受精, *西并农业大学学报*, 1996, 24 (2): 12–16
- [41]刘灵等, 山羊卵巢卵母细胞的体外成熟和体外受精, *西北农业大学学报*, 1992, supp20: 111–114
- [42]张涌等, 山羊大腔卵泡卵母细胞的体外成熟和体外受精, *河北农业大学学报*, 1998, 21: 45–49
- [43]周欢敏等, 山羊卵巢无腔卵泡卵母细胞的体外生长, *中国兽医学报*, 1999, 19 (3): 301–304
- [44]谭景和等, 山羊卵母细胞发育的超微结构研究, *解剖学报*, 1992, 23:106–110
- [45]刘喆等, 体外培养绵羊卵母细胞超微结构的变化, *内蒙古大学学报*, 2000, 31 (2): 223–229
- [46]刘喆等, 体外培养绵羊卵母细胞核质成熟的研究, *内蒙古大学学报*, 2000, 31 (1): 101–106
- [47]周红林等, 绵羊卵母细胞体外核成熟抑制及其对胚胎发育潜力的影响,*动物学报*,2002,48(6): 741–747
- [48]Webb. R, et al. Factors affecting folliculogenesis in ruminants . *Anim. Sci.*, 1999, 68 : 257–284
- [49]Telfer.EE. In vitro models for oocyte development. *Theriogenology*, 1998, 49 : 451–460
- [50]张志平, 提高牛体外胚胎囊胚发育率的研究, 西北农业大学硕士论文, 2002
- [51]Fair T et al. Ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles.*Anat Embryol*, 1997, 19 5: 327–335

- [52]Irving R et al. Ultrastructure of the basal lamina of bovine ovarian follicles and its relationship to the membrana granulosa. *J. Reprod Fert*, 2000, 118 : 221–228
- [53]Fair T. Nucleus ultrastructure and transcriptional activity of bovine oocytes of preantral and early antral follicles. *Mol Reprod*, 1997, 46 : 208–215
- [54]Anderson E et al. Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *J Cell Biol*, 1976, 71 : 680–686
- [55]孙青原等, 牛卵母细胞发育的超微结构研究, 山东农业大学学报, 1989, 4: 9–16
- [56]Greewald GS. Isolation and preliminary characterization of pig primordial follicles. *J. Reprod Fert*, 1989, 87 : 561–571
- [57]李云龙, 猪卵母细胞发育的超微结构研究, 东北农学院学报, 1983, 14: 69–75
- [58]谭景和, 山羊卵子的研究, 东北农业大学博士论文, 1988
- [59]Wu B et al. Dynamics of microtubule and meiotic spindle formation during in vitro maturation of bovine oocytes. SSR meeting.
- [60]King W A et al. Meiosis in bovine oocytes matured in vitro and in vivo. *Acta Vet Scand*, 1986, 27 : 267–269
- [61]Motlik et al. Meiotic competent in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. *J Reprod Fertil*, 1984, 72 : 323–328
- [62]Crozet N et al. Nuclear fine structure and RNA synthesis in bovine oocyte from antral follicles. *Gamete Res*, 1986, 14 : 65–73
- [63]孙青原等, 牛卵母细胞发育过程中的细胞核变化, 东北农学院学报, 1990, 14: 69–75
- [64]孙青原等, 牛卵丘-卵母细胞复合体体外成熟前后超微结构, 东北农业大学学报, 1996, 27: 158–164
- [65]谭景和等, 体外培养前黄牛卵母细胞的分类、形态结构及成熟能力的研究, 中国农业科学, 1987, 2283–85
- [66]Wassarman P M et al. The mammlia ovum. In: Knobil E and Neill JD(eds). *The physiology of reproduction* 1994, New York : Raven Press, pp : 79–122
- [67]秦鹏春等, 猪卵母细胞体外成熟与体外受精的超微结构研究, 解剖学报, 1994, 25: 281–285
- [68]钱菊芬等, 牛卵母细胞体外成熟的超微结构变化, 兽医产科学进展, 陕西科学技术出版社, 1994, 10: 89–91
- [69]Cran D C. fine structure of sheep oocytes during antral follicular development. *J Reprod Fertil*, 1980, 59 : 125–132
- [70]Suzuki S. Ultrastructure and some biologic properties of human oocytes and granulosa cells cultured in vitro. *Fertil Steril*, 1981, 38 : 142 –148
- [71]钱菊芬等, 小鼠输卵管卵母细胞的形态学研究, 西北农业大学学报, 1991, 19: 22–25
- [72]刘建民等, 牛卵母细胞体外成熟的形态学观察, 兽医大学学报, 1991, 11: 88–89
- [73]牧人等, 羔山羊卵巢卵母细胞超微结构及核质成熟分析, 内蒙古大学学报, 1996, 27 (2): 250–255
- [74]Rajikin M. H et al. Ultrastructural studies of developing goats oocytes in vitro. *Theriogenology*, 1994, 42 : 1003–1016
- [75]Huynh K et al. Estrogen is not directly required for oocyte developmental competence. *Biol Reprod*, 2003, 6 : 26-30
- [76]Vanden Hurk R et al. Ultrastructure and viability of isolated bovine preantral follicles. *Hum Reprod Update*, 1998, 4 : 833–841

- [77]芮荣等, 山羊腔前卵泡卵母细胞发育的超微结构, 四川农业大学学报, 1998, 16: 464–466
- [78]周欢敏等, 山羊离体腔前卵泡的超微结构, 内蒙古畜牧科学, 1998, 4: 1–6
- [79]Yu N et al. Development of preantral follicles from undifferentiated cell and oocyte in the hamster preantral ovary in vitro: Effect of insulin Biol Reprod, 1999, 61 : 1558–1567
- [80]Hinrichs K et al. Effect of follicular components on meiotic arrest and resumption in horse oocytes. J Reprod Fertil, 1995, 104 : 149–156
- [81]Anne Grete Byskov et al. Role of gonadotrophins and meiosis activating sterols, MAS, in resumption of oocyte meiosis. J Reprod Dev, 1997, 43(9) : 31–32
- [82]Downs S M. Factors affecting the resumption of meiotic maturation in mammalian oocytes Theriogenology, 1993, 39 : 65–79
- [83]Aktas H et al. Maintenance of bovine oocytes in prophase of meiosis I by high cAMP. J Reprod Fertil, 1995, 105 : 227–235
- [84]Mattioli M et al. Concentration of cyclic AMP during the maturation of pig oocytes in vivo and in vitro. J Reprod Fertil, 1994, 100 : 403–409
- [85]Tsafiriri J, Hillensjo. Effect of cyclic AMP on the isolated human oocyte cumulus complex. Hum Reprod, 1993, 8 : 393–402
- [86]Schultz R M. Biochemical studies of mammalian oogenesis: protein synthesis during oocyte growth and meiotic maturation in the mouse. J Cell Sci, 1977, 24 : 167–194
- [87]Choi T et al. Activation of protein p34^{cdc2} kinase activity in meiotic and meiotic cell cycle in mouse oocytes and embryos. Development, 1991, 113 : 789–795
- [88]Gorens N Dekel. Maintenance of meiotic arrest by a phosphorylated p34^{cdc2} is independent of cyclic adenosine 3' 5' -monophosphate. Biol Reprod, 1994, 51 : 956–962
- [89]Downs S M et al. Differential regulation of oocyte maturation and cumulus expansion in the mouse oocyte-cumulus cell complex by site-selective analogs of cyclic adenosine monophosphate. Dev Biol, 1995, 172 : 72–85
- [90]Shim et al. Inhibitory effect of purines in meiotic maturation of denuded mouse oocytes. Mol Reprod Dev, 1992, 31 : 280–286
- [91]Downs S M et al. Maintenance of meiotic arrest in mouse oocytes by purines: modulation of cAMP levels and cAMP phosphodiesterase activity. Gamete Res, 1989, 23 : 323–334
- [92]Sirard MA et al. Granulosa cells inhibit the resumption of meiotic arrest in vitro. Biol Reprod, 1990, 43 : 777–783
- [93]Kotsuji F et al. Effect of interactions between granulosa and thecal cells on meiotic arrest in bovine oocytes J Reprod Fertil, 1994, 100 : 151–156
- [94]Tornell J et al. Resumption of rat oocyte meiosis is paralleled by microinjection of cGMP. Acta Physiol Scand, 1990, 139 : 511–517
- [95]Jagiello G et al. A note on the inhibition of in vitro meiotic maturation of mammalian oocytes by dibutyryl cyclic AMP. J Exp. Zool, 1981, 218 : 309–311
- [96]Moor R M et al. Temperature induced abnormalities in sheep oocytes during maturation J Reprod. Fertil, 1985, 75 : 467–473
- [97]芮荣, 山羊卵巢腔前卵泡卵母细胞体外发育与成熟的研究, 西北农业大学博士论文, 1996
- [98]Carroll J, Swann K. Spontaneous cytosolic calcium oscillations driven by inositol triphosphate occur during in vitro maturation. J Biol Chem, 1992, 267(16)11 : 196–201
- [99]Deng M Q et al. Spontaneous and fertilization induced Ca²⁺ oscillations in mouse immature germinal vesicle stage oocytes. Biol Reprod, 1998, 58 : 807–813

- [100]孙青原, 牛卵母细胞体外成熟、冷冻及受精的研究, 东北农业大学博士论文, 1994
- [101]Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signaling. *Nature*, 1993, 361 : 315–325
- [102]Masui Y et al . Cytoplasmic control nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes[J]. *J Exp Zool*, 1971, 177 : 129–146
- [103]Smith L D, Ecker. The interaction of maturation of steroids with *Rena Pipiens* oocytes in the induction of maturation. *Dev Biol*, 1971, 25 : 232–247
- [104]Maller J L et al. Can sequencing shed light on cell cycling. *Nature*, 2001, 409 : 844–846
- [105]Taieb F et al. On cyclins, oocytes and eggs. *Mol Reprod Dev*, 1997, 48 : 397–411
- [106]Eppig J J et al. Mammalian oocyte growth and development. *Mol Reprod Dev*, 1996, 44 : 260–273
- [107]Masui Y. The role of cytotostatic factor(CSF)in the control of oocyte cell cycle:Asummary of 20 years of study. *Dev growth Differ*, 1991, 33 : 543–551
- [108]Sagata N, The c-mos protooncogene product is a cytotostatic factor responsible for meiotic arrest invertebrate eggs. *Nature*, 1989, 342 : 512–518
- [109]Crosby I M et al. Changes in protein phosphorylation during the maturation of mammalian oocytes in vitro. *J Exp Zool*, 1984, 229 : 59–466
- [110]Kastrop P M M et al. Changes in protein synthesis and phosphorylation pattern during bovine oocyte maturation in vitro. *J Reprod Fertil*, 1990, 90 : 305–310
- [111]Sun Q Y et al. MAP kinase activity is down regulated by phorbol ester during mouse oocyte maturation and egg activation in vitro *Mol Reprod Dev*, 1999, 52 : 310–318
- [112]Sun Q Y et al. cAMP inhibits MAP kinase activation and reinitiation of meiosis, but exerts no effects after germinal vesicle breakdown (GVBD) in mouse oocytes. *Reprod Fertil Dev*, 1999, 11 : 81–86
- [113]Sun Q Y et al. MAP kinase in human eggs. *Zygote*, 1999, 7 : 1851–1854
- [114]Fissore R A et al. Potential role of mitogen-activated protein kinase during meiotic resumption in bovine oocytes *Biol Reprod*, 1996, 55 : 1261–1270
- [115]Inoue M et al. Activation of mitogen-activated protein kinase during meiotic maturation in porcine oocytes. *Zygote*, 1995, 3 : 265–271
- [116]Inoue M et al. mitogen-activated protein kinase translocates into the germinal vesicle and induces germinal vesicle breakdown in porcine oocytes. *Biol Reprod*, 1998, 58 : 130–136
- [117]Verlhac M H et al. In microtubule organization during meiotic maturation in the mouse. *Dev*, 1996, 122 : 815–822
- [118]Krisher R L et al. Response of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogenology*, 1998, 49 : 103–114
- [119]Yang X et al. Control of oocyte maturation in cows-biological factors. *Theriogenology*, 1998, 49 : 471–482
- [120]薛庆善等, 合成培养基, 体外培养的原理与技术, 科学出版社, 2001, 1200pp
- [121]Eckert J et al. In vitro maturation, fertilization and culture to blastocyte of bovine oocytes in protein free media. *Theriogenology*, 1995, 43 : 1211–1225
- [122]Gardner DK et al. Bovine oocyte maturation in a completely defined medium:replacing serum with recombinant albumin and hyaluronan. *Theriogenology*, 2001, 55 : 471–478
- [123]Sakaguchi M et al. A combination of EGF and IGF-I accelerates the progression of meiosis in bovine follicular oocytes in vitro and fetal calf serum neutralizes the acceleration effect. *Theriogenology*, 2000, 54(8) : 1327-1342
- [124]鄂征等, 组织培养技术, 人民卫生出版社, 1998,346pp
- [125]Ocana Ouero JM et al. The influence of different types of media supplement on the meiotic maturation

- of bovine oocytes in vitro. *Theriogenology*, 1994, 41 : 191–202
- [126]Figueiredo J R et al. Extracellular matrix protein and basement membrane: their identification in bovine ovaries and significant for the attachment of cultured preantral follicles. *Theriogenology*, 1996, 45 : 889–895 (1): 42–52
- [127]陈俊颖, 山羊体外受精及其影响因素的研究, 第三军医大学硕士论文, 2002
- [128]Armstrong D T et al. Gonadotropin stimulation regimens for follicular aspiration and in vitro embryo production from calf oocytes. *Theriogenology*, 1994, 42 : 1227–1236
- [129]Lawrence T S et al. Binding of human chorionic gonadotropin by rat cumulus oophorus and granulosa cells. *Endocrinology*, 1980, 106 : 1114–1118
- [130]Rose T A et al. Fertilization of in vitro matured oocytes from golden hamster. *J Exp Zool*, 1983, 226–481
- [131]Leibfried–Rutledge M L et al. Development of bovine oocytes matured in vitro or in vivo. *Biol Reprod*, 1987, 36 : 376–382
- [132]Margot A et al. Involvement of steroid hormones on in vitro maturation of pig oocytes. *Theriogenology*, 2002, 57 : 811–821
- [133]Beker A R C L et al Effect of 17-estradiol on the in vitro maturation of bovine oocytes. *Theriogenology*, 58 (2002), 1663-1673.
- [134]Mingoti G Z et al. Regulation of estradiol of oocyte maturation in the bovine. *Anim reprod Sci*, 69(2002), 175–186
- [135]Apa R et al. Growth hormone induces in vitro maturation of follicle–cumulus–enclosed rat oocytes. *Mol. Cell Endocrinol*, 1994, 106 : 207–212
- [136]Wang W et al. Synergetic effects of EGF factor and gonadotropins on the cytoplasmic maturation of pig oocytes in a serum–free medium. *Zygote*, 1995, 3 : 345–350
- [137]Coskun S et al. Mechanism of action of epidermal growth factor– induced porcine oocyte maturation. *Mol.Reprod Dev*, 1994, 42 : 311–417
- [138]Xia P et al. Effect of IGF– I on the pig oocyte maturation, fertilization and early embryonic development in vitro, and on granulosa and cumulus cell biosynthetic activity. *Mol.Reprod.Dev*, 1994, 38 : 373–379
- [139]Chang M C The maturation of rabbit oocytes in culture and their maturation, activation, fertilization and subsequent development in the fallopian tubes. *J Exp.Zool*, 1955, 128 : 379–399
- [140]Gonalves P B et al. The inhibitory effect of bovine follicular fluid on in vitro oocyte nuclear maturation depends on the follicular size *Theriogenology*, 2001, 5 : 473–579
- [141]Huang W T et al. Effect of fluid on the in vitro maturation and development of porcine oocytes. *Asian-Aust.J.Anim.Sci.vol*, 2001, 14 (10) : 1360-1366..
- [142]Hinrichs K. Effect of fluid on the in vitro maturation and development of horse oocytes. *Biol Reprod*, 2002, Jul, 67(1) : 256–62
- [143]Raghu H M. Effect of follicular size on buffalo oocytes and embryos in vitro maturation *Reprod Fertil Dev*, 2002, 14(12) : 55–61
- [144]Schramm R D et al. FSH priming of rhesus monkeys enhances meiotic and developmental competence of oocytes matured in vitro. *Biol Reprod*, 1994, 51 : 904–912
- [145]Schramm R D et al. Effects of granulosa cells and gonadotrophins upon nuclear and cytoplasmic maturation in vitro of oocytes from nonstimulated rhesus monkeys. *Hum Reprod*, 1995, 10 : 887–895
- [146]Barnes F L et al. Embryo cloning in cattle: The current state of technology. *Embryo Transfer Newsletter*, 1991, 6(1) : 1–6
- [147]Hendridsen PJ et al. Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. *Theriogenology*, 2000, 36(1) : 19–24

- [148]Tsatriri P et al. Characterization of the embryotrophic activity of exogenous protein-free oviduct conditioned medium used in culture of cattle embryos. *Biol.Reprod*, 1993, 49 : 582–587
- [149]Hyttel P et al. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, 1997, 47 : 23–32
- [150]Xu ZZ et al. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biol. Reprod*, 1995, 3 : 951–957
- [151]Hashimoto S et al. Effects of cumulus cell density during in vitro maturation of the developmental competence of bovine oocytes, *Theriogenology*, 1998, 50(1) : 334–519
- [152]Byskov A G et al. Cumulus cells of oocyte-cumulus complexes secrete a meiosis-activating substance when stimulated with FSH. *Mol.Reprod.Dev*, 1997, 46(3) : 296–305
- [153]Vanderhyden B C et al. Mouse oocytes promote proliferation of granulosa cells from preantral and antral follicles in vitro. *Biol Reprod*, 1992, 46 : 1196–1204
- [154]Bar-Ami S et al. The development of meiotic competence in the rat :Role of hormones and of stage of follicular development. *Gamete Res*, 1986, 13 : 39–64
- [155]Dekel N et al. Maturation of the rat cumulus oophorus cells of oocyte cumulus complexes secrete a meiosis activating substance when stimulated with FSH . *Mol. Reprod.Dev*, 1997, 46 : 296-305
- [156]Park J I et al. Development of porcine oocytes from preovulatory follicles of different sizes after maturation in media supplemented with follicular fluids. *Reprod Fertil Dev*, 2000, 12(34) : 133-139
- [157]Hawk D J et al. Effects of follicular fluid at fertilization in vitro on sperm penetration in pig oocytes. *J.Reprod.Fertil*, 1993, 99 : 97-103.
- [158]Abeydeera L R et al. Glutathione content and embryo development after in vitro fertilization of pig oocytes matured in the presence of a thiol compound and various concentrations of cysteine. *Zygote*, 1999, 7 : 203-210
- [159]Moor R M et al. Oocyte maturation and embryo failure. *Hum. Reprod Update*, 1998, 4 : 223-236
- [160]Winston N J et al. Can the mouse embryo provide a good model for the study of abnormal cellular development seen in human embryos? *Hum Reprod*, 1992, 7 : 1291-1296
- [161]Iudica C et al. Antioxidants during in vitro oocyte maturation affect their in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology*, 1999, 51 : 378-383
- [162]De Matos et al. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development effect of beta-mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology*, 2000, 53 : 761-771
- [163]Hashimoto S et al. Excessive concentration of glucose during in vitro maturation impairs the developmental competence of bovine oocytes after in vitro fertilization:relevance to intracellular reactive oxygen species and glutathione contents. *Mol. Reprod.Dev*, 2000, 56 : 520-526
- [164]Palasz A T et al. The effect of macromolecular supplementation on the surface tension of TCM199 and the utilization of growth factors by bovine oocytes and embryos in culture. *Anim.Reprod.Sci*, 2000, 58 : 229-240
- [165]Sengoku K et al. Requirement of nitric oxide for murine oocyte maturation embryo development and trophoblast outgrowth in vitro. *Mol. Reprod Dev*, 2001, 58 : 262-268
- [166]Luciano A M et al. Effect of different levels of intracellular cAMP on the in vitro maturation of cattle oocytes and their subsequent development following in vitro fertilization. *Mol. Reprod.Dev*, 1999, 54 : 86-91
- [167]Robert C et al. Presence of Bcl-x and Bax mRNA in bovine cumulus-oocyte complex[J]. *Theriogenology*, 1999, 51 : 191-125

- [168]Mogas T et al. Effect of method of recovery on the number and type of oocytes obtained for IVM.J. Reprod.Fertil, 1992, 9 : 53-57
- [169]Martino A et al. Influence of the collection techque of prepubertal goat oocytes on in vitro maturation and fertilization. Theriogenology, 1994, 42 : 859-873
- [170]郭继彤等, 从屠宰山羊卵巢制备核移植受体卵母细胞的研究, 西北农业大学学报, 1998,7 (5): 127-130
- [171]郭继彤, 成年体细胞克隆山羊研究。西北农林科技大学博士论文, 2000
- [172]Noel B et al. Ovarian follicular dynamics in suffulk orine different periods of the year. J Reprod.Fertil, 1993, 99 : 695-700
- [173]Chemineau P et al. Implications of recent advances in reproductive physiology for reproductive management of goats. J Reprod.Fertil.Suppl, 1999, 54:129-142
- [174]Das G K rt al. Efficiency of various collection methods for oocyte retrieval in buffalo. Theriogenology, 1996, 46 : 1403-1411
- [175]Rho G J et al. Comparisons of oocyte maturation times and of three methods of sperm preparation for their effects on the production of goat embryos in vitro. Theriogenology, 2001, 1, 56(3) : 503-516
- [176]Hanada A et al. In vitro fertilization of goat oocytes obtained by superovulation, J Anim. Reprod, 1985, 31 : 21-26
- [177]Qian J F et al. Research on in vitro fertilization of goat oocytes from in vivo maturation.Theriogenology, 1991, Biol.Reprod, 1991, 1 : 35-40
- [178]Younis A I In vitro fertilization of goat oocytes from in vitro maturation,Biol Reprod, 1991, 44 : 1177-1182
- [179]Chang M C Fertilization capacitation of Spermatozoa deposited into the Follopian tube[J] Nature, 1951, 169-176
- [180]Austin C R Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. J. Sci. Res. Ser B, 1951, 4 : 518-526
- [181]Zaneveld L D et al. Human sperm capacitation and the acrosome reaction. Human Reprod, 1991, 9 : 1265-1274
- [182]Han H L et al. Inhibition of the human sperm capacitation and the acrosome reaction by a high molecular weight factor from hum seminal plasma. Fertil Steril, 1990, 54 : 1177-1179
- [183]Fraster L R Mechanism regulating capacitation and the acrosome reaction. Colloque Inserm Text L td, 1995, 17-23
- [184]Emiliozzi C et al. Protein tyrosine phosphorylation is associated with capaciation of human sperm in vitro but is not sufficient for its completion Biol Reprod, 1997, 56 : 674-679
- [185]Parrish J J et al. Capacitation of bovine sperm by heparin inhibibility effect of glucose and role of intracellular P H. Biol. Reprod, 1989, 41 : 683-699
- [186]Mahi C A et al. The effect of temperature,osmolality and hydrogen in concentration on the activation and acrosome reaction Of golden hamster spermatozoa.Reprod Fertil, 1973, 35 : 55-66
- [187]Olighant G et al. Capacitation of raggit spermatozoa in vitro.Biol Reprod, 1975, 12 : 260-274
- [188]任克良等, 家兔体外受精技术研究, 华北农学报, 2000, 15 (1): 135-138
- [189]Roldan E R et al. Polyphoinositide breakdown and subsequent exocytosis in the Ca²⁺ ionophore-induced acrossome reaction of mammalian spermatozoa Biochem. J, 1989, 259 : 397~406
- [190]Dinauer M C et al. Cyclic relay in dietyostelium discoideum.J Cell Biol, 1980, 86 : 537-541
- [191]Shamsuddin M et al. A simple spermatozoa for in vitro fertilization in the bovine. Anim.Reprod Sci, 1993, 66 : 122-122

- [192]Funahashi H et al. Effects of follicular fluid at fertilization in vitro on sperm penetration in pig oocytes. *J. Reprod. Fertil*, 1993, 99 : 97-103
- [193]McCaffrey C et al. Successful co-culture of 1-4-cell cattle ova to the morula or blastocyst stage. *J. Reprod. Fertil*, 1991, 92 : 119-124
- [194]谭世俭等, 受精用液种类型对牛卵母细胞体外受精的影响, *中国兽医学报*, 1994, 14 (2): 140-145
- [195]Lu K H et al. *Proc British Soc Anim Prod 92nd Meet March*, 1987, 23-25
- [196]Huneau D et al. Estrus sheep serum as a potent agent for ovine IVF: effect on cholesterol efflux from spermatozoa and the acrosome reaction. *Theriogenology*, 1994, 42 : 1017-1023
- [197]Naomi K et al. Development in vivo and in vitro to blastocysts of porcine oocytes matured and fertilized in vitro. *J Reprod Dev*, 2001, 47 : 303-310.
- [198]Pollard J W et al. Comparative cryobiology of in vivo and in vitro derived bovine embryos. *Theriogenology*, 1993, 39 : 287-289
- [199]Kuran J et al. Development and protein synthetic activity of bovine embryos produced in vitro in different culture systems. *Theriogenology*, 2001, 55 : 593-606
- [200]Holm P et al. Effect of oviduct epithelial cells on the fertilization and development of sheep oocytes in vitro. *Anim. Reprod. Sci*, 1994, 36 : 227-241
- [201]Nagashima H et al. Developmental competence of in vivo and in vitro matured porcine oocytes after subzonal sperm injection. *Mol. Reprod. Dev*, 1996, 45 : 359-463
- [202]Schramm R D et al. Chromatin configurations and meiotic competence of oocytes are related to follicle diameter nonstimulated rhesus monkeys. *Biol. Reprod*, 1993, 48 : 349-356
- [203]Pavlok A et al. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol. Reprod Dev*, 1992, 31 : 63-67
- [204]Pavlok A et al. Transcriptional activity and nuclear ultrastructure of 8-cell embryos developed by in vitro maturation and fertilization of oocytes from different growth categories of antral follicles. *Mol. Reprod. Dev*, 1993, 35 : 233-243
- [205]Tesarik J et al. Involvement of oocyte coded message in cell differentiation control of early human embryos. *Development*, 1989, 105 : 317-322
- [206]Latham J et al. Ooplasm transfer in mature human oocytes. *Mol Hum Reprod*, 1998, 4 : 269-280
- [207]Ludwig T E et al. Differential effect of hexoses on hamster embryo development in culture [J]. *Biol. Reprod*, 2001, 64 : 1366-1374
- [208]Tenneille E et al. Relationship between development metabolism, and mitochondrial organization in 2-cell hamster embryos in the presence of low levels of phosphate. *Biol Reprod*, 2001, 65 : 1648-1654
- [209]Michelle Lane et al. Lactate regulates pyruvate uptake and metabolism in the preimplantation mouse embryo. *Biol Reprod*, 2000, 62 : 16-22
- [210]Narinder K et al. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. *Biol Reprod*, 2000, 62 : 847-856
- [211]Fallon J V et al. Pyruvate revisited: nonmetabolic role for pyruvate in preimplantation embryo development. *Theriogenology*, 1995, 43 : 288 (abstract)
- [212]Johnson M H et al. Radical solution and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos in vitro? *Bio Essays*, 1994, 16 : 31-38
- [213]Takagi Y et al. Development of bovine oocytes matured, fertilized and cultured in a serum-free, chemically defined medium. *Theriogenology*, 1991, 35 : 1197-1207
- [214]Brackett B G et al. Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Reprod*, 1982, 27 : 147-158

- [215]Holm P J et al. Kinetic of early in vitro development of bovine in vivo and in vitro-derived zygotes produced and/or cultured in chemically defined or serum-containing media.Reprod, 2002, 123 : 553-565
- [216]Diez Y et al. Delipidating in vitro-produced bovine zygotes: effect on further development and consequences for freezability. Theriogenology, 2001, 55 : 923-936
- [217]Farin C E et al. Effect of early restriction on development of bovine embryos produced in vitro.Biol Reprod, 1996, 54 : 137(Abstract)
- [218]刘东军等,牛体外受精胚胎在成分确定培养液内的发育,内蒙古大学学报,2001,32 (3): 324-326
- [219]Holm P et al. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum proteins.Theriogenology, 1999, 52 : 683-700
- [220]Olson S E et al. Reduced oxygen tension and EDTA improve bovine zygote development in a chemically defined medium.J.Anim.Sci, 2000, 78 : 152-157
- [221]Watson A J et al. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels,blastocyst development,cell number, and apoptosis.Biol. Reprod, 2000, 62 : 355-364
- [222]Niemann H W et al. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions:implications for subsequent development.Theriogenology, 2000, 53 : 21-34
- [223]Makarevich A V et al. Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor I during in vitro maturation and culture.Biol Reprod, 2002, 66 : 386-392
- [224]Palma G A et al. Effect of insulin-like growth factor I(IGF-I) at high concentrations on blastocyst development of bovine embryos produced in vitro. Reprod.Fertil, 1997, 110 : 347-353
- [225]Moreira F et al. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on development of in vitro derived bovine embryos. Theriogenology, 2002, 57 : 895-907
- [226]Sabine Kollé et al. Growth hormone GH receptor expression and GH-mediated effects during early bovine embryogenesis.Biol Reprod, 2001, 64 : 1826-1834
- [227]Mtago N R et al. Growth factor and growth hormone enhance in vitro embryo production and post-thaw survival of vitrified bovine blastocysts. Theriogenolog, 59(2003) : 1393-1402
- [228]Thompson J G et al. In vitro development of early sheep embryos is superior in medium supplemented with human serum compared with sheep serum of human serum albumin.Anim.Reprod.Sci, 1992, 28 : 61-68
- [229]Spindle A L et al. Hatching, attachment and outgrowth of mouse blastocyst in vitro;fixed nitrogen requirements.J Exp Zool, 1972, 30 : 493-497
- [230]Eppig J J et al. A typical maturation of oocytes of strainlj mice. Hum Reprod, 1994, 9 : 1136-1142
- [231]Steeves T E et al. Temporal and differential effects of amino acids on bovine embryo development in culture.Biol. Reprod, 1999, 61 : 731-740
- [232]John D et al. Amino acids and potassium simplex optimized medium.Biology of Reprod, 2000, 63 : 281-293
- [233]Bavister B D Culture of preimplantation embryos:facts and artifacts.Human Reprod Update, 1995, 1 : 91-143
- [234]Furnus C C et al. Effect of hyaluronic acid on development of in vitro production bovine embryos. Theriogenology, 1998, 49 : 1489-1499
- [235]Guerin P M et al. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the preimplantation embryo and its surroundings[J].Hum.Reprod.Update, 2001, 7 : 175-189
- [236]Fischer B et al. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys,hamster and rabbits.J Reprod

Fertil, 1993, 99 : 673-679

- [237]Alexandre J et al. Regulation of early embryo development.Reproduction 2002, 23 : 479-486
- [238]Noda Y et al. Improvement of superoxide radicals in in mouse tow cell block phenomenon.Mol Reprod Dev, 1991, 28 : 256-260
- [239]Gardiner C S et al. Glutathione is present in reprod utive secretions and improves development of mouse embryos after chemically induced glutathione depletion.Biology of Reprod, 1998, 59 : 431-436
- [240]Mizushima S et al. Fertilizability and developmental capacity of bovine oocytes cultured indivioually in a chemically defined maturation medium. Theriogenolog, 2001, 55 : 1431-1455
- [241]Lane M. Mechanism for managing cellular and homeostatic stress in vitro. Theriogenology, 2001, 55 : 225-236
- [242]Day B N, Reproductive biotechnologies. current status in porcine reproduction. Anim Sci Reprod, 2000 : 161-172
- [243]Swain J E et al. Development and viability of in vitro derived porcine blastocysts cultured in UCSU23 and G1.2/G2.2 sequential medium. Theriogenolog, 2001, 56 : 456-469
- [244]Gutierrez-Adan A et al. Effect of the in vitro culture-system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio bovine embryos. Theriogenology, 1994, 41 : 1241-1249
- [245]Izquierdo D et al. Effect of culture media on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes Theriogenology, 1999, 5 2: 847-861
- [246]Kane M T et al. The role of nutrients peptide growth factors and coculture cells in development of preimplanation embryos in vitro. Theriogenology, 1992, 38 : 297-313
- [247]Pegraro L M C et al. Comparison of sex ratio and cell number of IVM-IVF bovine blastocysts co-culture with bovine oviduct epithelial cells or with vero cells. Theriogenolog, 1998, 49 : 1579-1590
- [248]Rizos D et al. Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. Theriogenology, 2001, 56 : 1-16
- [249]Gardner D K et al. Amin acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture.Biol Reprod, 1993, 48 : 377-385
- [250]Hiroyoshi et al. In vitro maturation;fertilization of bovine oocytes and embryo culture in a serum-free medium.Asian-Aust.J.Anim.Sci, 2001, 14special issue : 38-42
- [251]Thomsonm JG et al. Effect of inhibitions and uncouplers of oxidative phosphorylation during compaction and blastulation of bovine embryos cultured in vitro.J Reprod Fertility, 2000, 118 : 47-55
- [252]Koji et al. Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. Biol Reprod, 2002, 66 : 112-119.
- [253]Kazuhiro et al. Successful piglet production after transfer of blastocysts.produced by a modified in vitro system.Biol Reprod 2002, 66 : 1033-1041
- [254]Zarir E et al. Oxgen metabolism causes chromosome breaks and is associated with the neuronak apoptosis observed in DNA double-strand break repair mutants. Curr Biol, 2002, 12 : 397-402
- [255]Nguyen V T et al.S tage specific effects of the osmolarity of a culture medium on the development of parthenogenetic diploids in the pig.Theriogenology, 2003, 59 : 719-734
- [256]Paula-lobes F F et al. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on development of in vitro derived bovine embryos. Theriogenology, 2002, 57 : 895-907
- [257]Azambuja R M et al. Effect of low temperatures on in vitro matured bovine oocytes. Theriogenolog, 1998, 49 : 1155-1164
- [258]O'Shea K S. Embryonic stem cell methods of development. Anat Res(New Anat) 1999, 257 : 32-41
- [259]Robertson E J. Teratocarcinomas and embryonic stem cell: a practical approach. IRL Pres.

Oxford-Washington DC(1987)

- [260]姚鑫, 胚胎干细胞的特性、体外分化及其应用前景, 上海免疫学杂志, 1999, 19(1): 129-131
- [261]Evans M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981, 292(9) : 154-156
- [262]Martin G R. Isolation of a pluripotent cell lines from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1981, 78(2) : 7634-7638
- [263]Axelrod H R. Embryonic Stem cell lines derived from blastocysts by a simplified technique. *Dev Biol*, 1984, 101 : 225-228
- [264]Kaufman M H et al. Establishment of pluripotential cell lines from haploid mouse embryonic embryos. *J Embr Exp Morph*, 1983, 73 : 249-261
- [265]Wobus A M et al. Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo. *Exp Cell Res*, 1984, 152 : 212-219
- [266]Brook FA, Gardner RL. The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(11) : 5709-5712
- [267]Tojo H et al. Establishment of a novel embryonic stem cell line by a modified procedure. *Cytotechnology*, 1995, 55(2) : 161-165
- [268]Pesce M et al. Apoptosis in mouse primordial germ cells: a study by transmission and scanning electron microscope. *Anat Embryol*, 1994, 189 : 435-440
- [269]Munsie M J et al. Isolation of pluripotent embryonic stem cells from reprogrammed adult mouse somatic cell nuclei. *Curr Biol*, 2000, 10(16) : 989-992
- [270]Kawase E et al. Mouse embryonic stem (ES) cell lines established from neuronal cell-derived cloned blastocytes. *Genesis*, 2000, 28(3-4) : 156-163
- [271]Wakayama T *et al.* Mice cloned from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1999, 96 : 14984-14989
- [272]丛笑倩等, 小鼠胚胎干细胞建系过程的核型及特性分析, 实验生物学报, 1987, 20: 237-251
- [273]尚克刚等, 小鼠囊胚的不同遗传背景对形成 ES 细胞集落的影响, 北京大学学报(自然科学版), 1993, 29(2): 196-201
- [274]尚克刚等, 饲养层对维持新建 ES 细胞系的影响, 北京大学学报(自然科学版), 1994, 30: 500-507
- [275]刘红林等, 小鼠孤雌胚胎干细胞集落的建立, 动物学报, 1998, 44: 112-114
- [276]Piedrahita J A et al. Influence of feeder layer type on the efficiency of isolation of porcine embryo-derived cell lines. *Theriogenology*, 1990, 34(5) : 866-877
- [277]Doetschman T et al. Establishment of hamster blastocyst-derived embryonic stem (ES) cells. *Dev Biol*, 1998, 127 : 224-227
- [278]Saito S et al. Bovine embryonic stem cell-like cell lines cultured over several passages. *Dev Biol*, 1992, 201 : 134-141
- [279]Sims M M et al. Production of fetuses from totipotent cultured bovine inner cell mass cells. *Theriogenology*, 1993, 39 : 313
- [280]White K L et al. Effect of non-serum supplemented media on establishment and maintenance of bovine embryonic stem-like cells. *Theriogenology*, 1995, 43(1) : 350
- [281]Ito T. Influence of stage and derivation of bovine embryos on formation of embryonic stem (ES) like colonies. *J Reprod Dev*, 1996, 42(5) : 129-133
- [282]Cibelli J B. Production of germline chimeric bovine fetuses from transgenic embryonic stem cells. *Theriogenology*, 1997, 47(1) : 241

- [283]Cibelli J B et al. Bovine chimeric offspring produced by transgenic embryonic stem cells generated from somatic cell nuclear transfer embryos. *Theriogenology*, 1998, 49(1) : 236
- [284]Mitalipova M et al. Pluripotency of bovine embryonic stem cells derived from precompacting embryos. *Cloning*, 2001, 3(2) : 59-67
- [285]钱永胜等, 小鼠 ES 细胞的分离及培养, *四川大学学报(自然科学版)*, 1996, 专辑, 135-141
- [286]杨奇, 牛胚胎干细胞的分离与克隆, 西北农业大学硕士毕业论文, 1999
- [287]安立龙, 牛胚胎干细胞的分离与克隆, 西北农业大学博士研究生毕业论文, 1999
- [288]Evans M J et al. Derivation and preliminary characterization of pluripotent cell lines from porcine and bovine blastocysts. *Theriogenology*, 1990, 33 : 125-128
- [289]Strojek R M et al. A method for cultivating morphologically undifferentiated embryonic stem cells from porcine blastocysts. *Theriogenology*, 1990, 33(4) : 901-913
- [290]Wheeler M B. Development and validation of swine embryonic stem cells. *Report Fertil Dev*, 1994, 6 : 563-568
- [291]Miyoshi K et al. Establishment of a porcine cell line from in vitro produced blastocysts and transfer of the cells into enucleated oocytes. *Biol Reprod*, 2000, 62 : 1640-1646
- [292]徐军, 猪胚胎干细胞的分离与克隆, 西北农业大学硕士研究生毕业论文, 1997
- [293]冯秀亮, 猪胚胎干细胞的分离与克隆, 西北农业大学硕士研究生毕业论文 1999
- [294]董晓等, 猪胚胎干细胞培养、分离与传代, *农业生物技术学报*, 2003, 11(9): 263-267
- [295]Handyside A. Towards the isolation of embryonic stem cell lines from the sheep. *Roux' s Arch Dev Biol*, 1987, 196 : 185-190
- [296]Tsuchiya R. Isolation of ICM-derived cell colonies from sheep blastocysts. *Theriogenology*, 1994, 41 : 321
- [297]Bongso et al. The growth of inner cell mass from human blastocysts *Theriogenology*, 1994,26(6) : 105-107
- [298]Tillmann S M. Isolation of ES-like cell lines from bovine and caprine preimplantation embryos. *J Anim Breed Genet*, 1996, 113 : 413-426
- [299]Campbell K H et al. Sheep cloned by nuclear transfer from cultured cell line. *Nature*, 1996, 1380 : 64-66
- [300]Graves K H. Derivation and characterization of putative pluripotential embryonic stem cells from preimplantation rabbit embryos. *Mol Repord Dev*, 1993, 36 : 424-428
- [301]Niemann H et al. Isolation and maintenance of rabbit embryonic stem cell like cells. *Theriogenology*, 1994, 41 : 265
- [302]赖良学, 家兔胚胎干细胞的分离与培养, 东北农大博士研究生学位论文, 吉林: 东北农业大学, 1995
- [303]童英等, 兔 ES 样细胞系的建立及其特性, *北京大学学报(自然科学版)*, 1997, 33(4): 500-507
- [304]Thomson J A et al. Isolation of a primate embryonic stem cell. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92 : 7844-7848
- [305]Thomson J A et al. Pluripotent cell lines derived from common Marmoset (*Callithrix Jachus*) blastocysts. *Biol Reprod*, 1996, 55(1) : 254-259
- [306]Cibelli JB et al. Parthenogenetic stem cells in nonhuman primates. *Science*, 2002, 295 : 819
- [307]Sukoran A et al. Embryonic stem cell derived from morulae. Inner cell mass. and Blastocysts of mink: comparasions of their pluripotencies. *Mol Reprod Dev*, 1993, 36 : 148-158
- [308]Wilmut I et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, 385 : 810-81

- [309]王鸿等, 以胚胎干细胞为核供体能促进异种重构胚的体外发育, 科学通报, 2002, 47(17): 1313-1316
- [310]Piedrahita J A et al. Generation of transgenic porcine chimeras using primordial germ cell-derived clones. Biol Reprod, 1998, 58 : 1321-1329
- [311]Gordon and K H. Production of embryos in vitro and its-impact on livestock production. Theriogenology, 1990, 33 : 77-87
- [312]Bormann C L et al. The effect of vitamins during maturation of caprine oocytes on subsequent developmental potential in vitro. Theriogenology, 2003, 59(5-6) : 1373-80
- [313]李亚东等, 颗粒细胞、卵泡液对山羊卵泡卵母细胞 IVM、IVF 的影响, 扬州大学硕士毕业论文 2003
- [314]Yu Y et al. The effect of follicle-stimulating hormone on follicular development, granulosa cell apoptosis and steroidogenesis and its mediation by insulin-like growth factor-I in the goat ovary. Theriogenology. 2003 Dec. 60(9) : 1691-704
- [315]Schams M et al. Steroidogenesis during in vitro maturation of bovine cumulus oocyte complexes and possible effects of tri-butyltin on granulosa cells. Biochem Mol Biol, 2003, 84(3) : 291-300
- [316]Mingoti G Z et al. Steroidogenesis in cumulus cells of bovine cumulus-oocyte-complexes matured in vitro with BSA and different concentrations of steroids. Animal Rep. Sci, 2002, 69 : 175-186
- [317]Behl R, Pandey RS. FSH induced stimulation of catalase activity in goat granulosa cells in vitro. Anim Reprod Sci, 2002, 15(3) : 215-218
- [318]旭日干等, 屠宰母牛卵细胞体外受精与发育的研究, 畜牧兽医学报, 1989, 20(3): 193-198
- [319]刘灵等, 山羊卵巢卵母细胞的体外受精. 国外畜牧学-草食家畜, 1992, (增刊): 93-96
- [320]Kruip TAM et al. The effect of estradiol-17 α on nuclear maturation of bovine oocytes. Proc, 11th int congr anim reprod A.I., 1998, 3 : 336-339
- [321]赵伟等, 激素对卵母细胞体外成熟的影响, 畜牧与兽医, 1998, 30(3): 134-135
- [322]江金益等, 水牛体外受精研究, 江苏农业学报, 1990, 6 (3): 25-30
- [323]Gonzalez E et al. Effects on in vitro embryo development and intracellular glutathione content of the presence of thiol compounds during maturation of prepubertal goat oocytes. Rodriguez- Lopez-Bejar M, Mertens MJ, Paramio MT. J Reprod Fertil, 1995, 103(2) : 293-298
- [324]Matos D G et al. The Importance of Having High Glutathione (GSH) Level After Bovine in Vitro Maturation on Embryo Development: Effect of β -Mercaptoethanol, Cysteine and Cystine. Theriogenology, 2000, 53 : 761-771
- [325]Moor R M et al. Oocyte maturation and embryo failure. Hum. Reprod Update, 1998, 4 : 223-236
- [326]De felici M et al. Involvement of thiol disulfide groups in the sensitivity of fully grown mouse oocytes to calcium free medium. J. Exp. Zool, 1987, 243 : 283-287
- [327]Eyestone W H et al FSH enhances developmental potential of bovine oocytes matured in chemically defined medium. Theriogenology, 1993, 39 : 216-221
- [328]Lim J M et al. Hansel Intracytoplasmic glutathione concentration and the role of β -mercaptoethanol in preimplantation development of bovine embryo theriogenology, 1996, 46 : 429-439
- [329]Keskin-tepe L et al. In vitro development of morulae from immature caprine oocytes, 1994, 2(2) : 97-102
- [330]LH K H. Effects of haparin on capacitation of frozen bovine spermatozoa used for in vitro maturation and fertilization of oocytes. 11th Int Cong on Anim Reprod and A I, 1988, (1) : 339-342
- [331]张锁链等, 羔山羊的超数排卵及体外受精, 内蒙古大学学报, 1994, 25 (2): 205-208
- [332]黄建民等, 诱导牛精子体外获能的培养基及方法, 中国兽医学报, 1999, 19 (2): 196-200
- [333]Izquierdo D et al. Effect of sperm capacitation and fertilization media on IVF and early embryo development of prepubertal goat oocytes Theriogenology, 1998, 49(8) : 1501-1513

- [334]Hahnel et al. comparisons of oocyte maturation times and of three methods of sperm preparation for their effects on the production of goat embryos in vitro. *Theriogenology*. 2002,56:503-516
- [335]Palomo M J et al. Effect of semen preparation on IVF of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology*, 1999, 51 : 927-940
- [336]Parrish J J et al Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development *Theriogenology*, 1995, 44 : 859-869
- [337]Nancarrow C D et al. Co-culture, oviduct secretion and the function of oviduct-specific glycoproteins *Cell Biol Int Decl*, 1994, 18(12) : 1105-1114.
- [338]Chartrain I et al. Development of the nucleolus in early goat embryos *Gamete Res*, 1987, 18 : 201-203
- [339]Pivko J et al. Nuclear fine structure and transcription in early goat embryos *Theriogenology*, 1994, 44 : 661-671
- [340]Acta Vet Oviduct epithelial cell co-culture of early porcine embryos *Theriogenology*, 1992, 3(4) : 349-55
- [341]Batt P A et al Oxygen concentrtrion and protain soure effect the development of preimplantation goat embryos in vitro.*Reprod. Fertil*, 1991, 9(3) : 601-607
- [342]Rosenkrans C F et al. Culture of bovine zygotes to the blastocyst stage: Effects of amino acids and vitamins. *Theriogenology*, 1991, 35 : 266-269
- [343]Gardner D K et al. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage in vitro in the absence of serum and somatic cells amino acids vitamins and culturing embryos in groups stimulate development *Biol reprod*, 1994, 50 : 390-400
- [344]Fujitani Y et al. Effects of oxygen tension, free radicals and hypotaurine on development of in vitro-derived bovine embryos *theriogenology*, 1996, 45 : 210-215
- [345]Bin Wang H et al. The in vitro *and* in vivo development of goat embryos produced by intracytoplasmic sperm injection using tail-cut spermatozoa *.Zygote*, 2003, 11 : 219-227
- [346]Aoyagi Yet al. Effects of culture systems on development of in vitro fertilized bovine ova into blastocysts *Theriogenology*, 1990, 34 : 749-759
- [347]Yadav P S et al. Effect of oviductal cell co-culture on cleavage and development of goat IVF embryos *Anim Reprod Sci*, 1998, 51(4) : 301-306
- [348]Keskintepe L et al. Term development of caprine embryos derived from immature oocytes in vitro *Theriogenology*, 1994, 42 : 527-535
- [349]Oikawa T et al. Birth weight and gestation length of Japanese black calves following transfer of embryos produced in vitro with or without co-culture.*Sci*, 2001, 63(5) : 515-9
- [350]Ellington J E et al. Bovine 1-2-cell embryo development using a simple medium in three oviduct epithelial cell coculture systems.*Biol.Reprod*, 1990, 43 : 97-104
- [351]Mermillod P et al. Characterization of the embryo trophic activity of exogenous protein- free oviduct-conditioned medium used in culture of cattle embryos *Reprod*, 1990, 43 : 97-10
- [352]Gutierrez Adan A et al. Effect of the in vitro culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology*, 2001, 55(5) : 1117-1126
- [353]Ktska, B et al. The effect of co-culture system on developmental capacity of bovine IVM/IVF oocytes. *Theriogenology*, 1995, 43 : 859-870
- [354]Keskintepe L et al. Term development of caprine embryos derived from immature oocytes in vitro. *Therio*, 1994, 42 : 527-535
- [355]Numabe T et al. Birth weight and gestation length of Japanese black calves following transfer of embryos produced in vitro with or without co-culture *Med Sci*, 2001, 63(5) : 515-519
- [356]Wrenzycki C et al. Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in

- pre-implantation bovine embryos. *Hum Reprod*, 2001, 16(5) : 893-901
- [357]Elhassan Y M et al. Amino acid concentrations in fluids from the bovine oviduct and uterus and in KSOM-based culture media *Theriogenology*, 2001, 55(9) : 1907-1918
- [358] Takada N et al. Conception rate after transfer of Japanese black cattle embryos produced in vitro *Vet Rec*, 1990, 126 : 581-582.
- [359]Prather R S et al. Cell-to-cell coupling in early-stage bovine embryos a preliminary report. *Theriogenology*, 1993, 9 : 561-567.
- [360]Van Soom A et al. Compaction rate of in vitro fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage *Theriogenology*, 1992, 38 : 905-919
- [361] Hasler J F et al. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results *Theriogenology*, 1995, 43 : 141-152
- [362] Hasler JF et al. Effect of donorembryo recipient interactions on pregnancy rate in a large scale bovine embryo transfer program. *Theriogenology*, 1987, 27 : 139-168
- [363]Thompson J G et al. Lamb birth weight is affected by culture system utilized during in vitro pre-elongation development of ovine embryos, *Biol Reprod*, 1995, 53 : 1385-1391
- [364]Abe H et al. Ultrastructure of bovine embryos developed from in vitro-matured and -fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or in serum-supplemented medium. *Mol Reprod Dev*, 1999, 53(3) : 325-35
- [365]Enders A C et al. Abnormal development of blastocysts and blastomeres in the rhesus monkey. *Biol Reprod*, 1982, 26 : 353-366
- [366]Ott M et al. Effects of bovine serum albumin and estrous cow serum on development and ultrastructure of in vitro-produced porcine embryos *Anat Histol Embryo*, 2002, 31(3) : 151-157
- [367]Abe H et al. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media *Mol Reprod Dev*, 2002, 61(1) : 57-66
- [368]Abe H et al. Ultrastructural differences in bovine morulae classified as high and low qualities by morphological evaluation. *Theriogenology*, 2002, 57(4) : 1273-1278
- [369]Cibelli J B et al. Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem-like cells *Nature Biotechnology*, 1998, 16 : 642-646
- [370]Bettauser J et al. Production of cloned pigs from in vitro systems. *Nat Biotechnol*, 2000, 18 : 1055-1059
- [371]李松等, 影响牛胚胎干细胞分离克隆因素的研究, *生物技术通报*, 2002, 3: 35-39
- [372]施渭康等, 胚胎干细胞定向诱导分化——新崛起的细胞工程, *细胞生物学杂志*, 2000, 22(4): 15-20
- [373]Conquet et al. Inhibited gastrulation in mouse embryos overexpressing the leukemia inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89 : 8195-8199
- [374]孟国良等, 小鼠胚胎干细胞系建立的方法学探讨, *遗传学报*, 2002, 29(7): 565-570
- [375]Thomson J A et al. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(17) : 7844-7848
- [376]Watson A J. Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev*, 1992, 31 : 87-95
- [377]Simmer R C M. Insuline-like growth factors and blastocysts development. *Theriogenology*, 1993, 39 : 163-175
- [378]Schuldiner M et al. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97 : 11307-11312

Study on the Optimization of in vitro Culture System of Embryos and Isolation Technology of Embryo Stem Cells in Goats

This study was to optimize the technologies for production of embryo in vitro, including in vitro maturation (IVM) of oocytes, in vitro fertilization (IVF) and in vitro culture (IVC) of embryos in goats to establish a perfect system for in vitro embryo production (IVP) and to make these technologies going out of laboratory to be used in the fields of embryonic engineering. At the same time, the isolation and generative culture of embryonic stem (ES) cells in goats were studied to provide the theoretic bases for post-embryonic engineering technologies such as nuclear transfer and transgenic technology etc.

Experiment one studied the IVM methods to increase the maturation rate of oocytes. Droplet method was used to culture oocytes to study of collection of oocytes, modification to maturation medium, supplementation of different hormones and antioxidants on the IVM of oocytes. Oocytes of grade A with uniform and compact cytoplasm and parceled by at least three layers of cumulus cells were chosen. The maturation rate increased by adding 1 μg E_2 , 5 μM β -mercaptoethanol (β -ME), which was a kind of antioxidant, and culturing 27h. Imported FSH and LH could be completely replaced by domestic chorionic gonadotrophin (the main ingredients were FSH and LH) and reduced the experiment cost under the same maturation effects.

Experiment two studied the optimization of IVF conditions to increase the quality and quantity of in vitro matured oocytes. The effects of three capacitation materials of heparin, caffeine and Ca^{2+} vector IA23187 and different capacitation methods of Percoll and swim-up methods were compared. The results showed that only the heparin group was better and had higher percentages of fertilization, cleavage and blastocyst. The cleavage rate of Percoll method was significantly higher than that of swim-up method. But there was no significant difference for blastocyst rate between the two methods. The motility rate of sperm by Percoll method was higher than that by swim-up method. However, the overall fertilization and development rates were still lower.

Experiment three aimed to establish a suitable culture system for IVC of goat embryos by optimizing culture procedure and screening culture medium. Studies by comparison among different co-culture cells, replacement procedures and basal culture media showed that, if only co-culture cells without considering the type of them, the embryos could overcome the 8~16-cell inhibition stage. The best procedure of using fetal calf serum (FCS) and BSA was adding BSA in the former stage of 48h and replacing it by FCS hereafter. All three kinds of medium, TCM199, CR1 and SOF, could be used as embryo culture media and SOF could be prepared simply and thus recommended to be used as basal medium.

Experiment four compared the ultrastructures of *in vivo* and *in vitro* embryos in goats by electronic microscope to evaluate *in vitro* embryo quality and culture system, and further provide theoretical bases of ultrastructure for improving *in vitro* embryo quality. The development of *in vitro* embryos was worse compared to *in vivo* embryos because of *in vitro* embryos containing a lot of cells with lipid droplets, abnormal mitochondria, loose gap junction and decreased nucleus to cytoplasm ratio.

Experiment five used three kinds of sources of *in vivo*, *in vitro* and activated blastocysts as materials to isolate embryo stem cells in goats. Different kinds of feeder layers of MEF and GEF, different sera such as FCS and newborn calf serum (NCS), different culture media of A, B and C (A was basal culture medium, B was A supplemented by leukemia inhibitory factor (LIF), and C was B supplemented by insulin growth factor I (IGF-I)) were compared to screen the conditions suitable for isolation of ES cells in goats. A strain of ES cells passed six generations. Rates of attachment and ICM clusters and passing times were analyzed. The results showed that using *in vivo* embryos and MEF feeder layers together with supplementing FCS, LIF and IGF-I was more suitable for isolation of ES cells of goats. The ES cells expressed alkaline phosphatase activity, normal karyotype and spontaneously differentiated into nurse-, epithelium- and fibroblast-like cells.

Key words: goats; oocyte; *in vitro* maturation; *in vitro* fertilization; embryo; *in vitro* culture; ES cells; isolation culture