

徐小波, 章熙霞, 王公金, 等. 猪极体的排出与退化规律及其活性保存[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(3): 599-604.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2018.03.017

猪极体的排出与退化规律及其活性保存

徐小波¹, 章熙霞², 王公金¹, 谭小东¹, 周晓龙¹

(1.江苏省农业科学院畜牧研究所/农业部种养殖结合重点实验室, 江苏 南京 210014; 2.南京市畜牧家禽研究所, 江苏 南京 210036)

摘要: 哺乳动物卵母细胞二次减数分裂分别产生第一极体(Pb I)和第二极体(Pb II), 极体(Pb)含有与卵母细胞相似的遗传物质。为探索猪 Pb 的排出与退化规律, 并建立有效的 Pb 保存方法, 从屠宰后的母猪卵巢中采集卵母细胞进行体外成熟培养及体外受精, 分别对 Pb I 和 Pb II 的排出与退化规律及其在不同保存温度下的存活情况进行研究。结果表明: Pb I 在卵母细胞体外培养 40 h 时排出率最高, Pb I 在 39 ℃ 条件下保存 6 h 形态正常率为 85.5%, 但存活率只有 18.2%, 4 ℃ 保存 40 h 存活率为 85.0%, -20 ℃ 保存 168 h 存活率为 95.0%, -196 ℃ 超低温保存 1 344 h 存活率和形态正常率分别达 89.1% 和 97.8%。Pb II 在卵母细胞受精后 20 h 排出率最高, Pb II 在 39 ℃ 条件下保存 16 h 形态正常率为 69.0%, 但存活率只有 34.5%, 4 ℃ 保存 30 h 存活率为 87.5%, -20 ℃ 保存 240 h 存活率为 84.6%, -196 ℃ 超低温保存 1 344 h 存活率和形态正常率分别达 87.0% 和 95.7%。

关键词: 猪卵母细胞; 第一极体; 第二极体; 存活率

中图分类号: S828.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2018)03-0599-06

The excretion and degeneration regularity of porcine polar bodies and its activity preservation

XU Xiao-bo¹, ZHANG Xi-xia², WANG Gong-jin¹, TAN Xiao-dong¹, ZHOU Xiao-long¹

(1. Institute of Animal Science, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Crop and Livestock Integrated Farming, Ministry of Agriculture, Nanjing 210014, China; 2. Institute of Animal and Poultry Science of Nanjing, Nanjing 210036, China)

Abstract: The mammalian oocytes produce the first polar body (Pb I) and the second polar body (Pb II) during the two meiosis, respectively. The polar bodies (Pbs) contain some genetic materials, which are similar to the oocytes. To explore the regularity of excretion and degeneration of pig Pb and establish effective method of Pb preservation, the oocytes were collected from the porcine ovaries for *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization. The excretion and degeneration of Pb I and Pb II and their survival condition at different storage temperatures were investigated. The results showed that the excretion rate of Pb I was highest at 40 h *in vitro* culture, the survival rate and morphologically normal rate of Pb I were 18.2% and 85.5% when cultured at 39 ℃ for 6 h, the survival rate of Pb I was 85.0% when conserved at 4 ℃ for 40 h, the survival rate of Pb I was 95.0% when conserved at -20 ℃ for 168 h, the survival rate and morphologically normal rate were 89.1% and 97.8% when cryopreserved at -196 ℃ for 1 344 h, respectively. Pb II had the highest excretion rate at 20 h after oocyte fertilization, the survival rate and morphologically normal rate of Pb II were 34.5% and 69.0%, respectively,

when cultured at 39 ℃ for 16 h, the survival rate of Pb II was 87.5% when conserved at 4 ℃ for 30 h, the survival rate of Pb II was 84.6% when conserved at -20 ℃ for 240 h, the survival rate and morphologically normal rate were 87.0% and 95.7%, respectively, when cryopreserved at -196 ℃ for 1 344 h.

收稿日期: 2017-09-14

基金项目: 农业部转基因生物新品种培育基金项目(2014ZX08006-004)

作者简介: 徐小波(1964-), 男, 江苏镇江人, 硕士, 研究员, 主要从事猪种质资源保存利用与开发研究。(E-mail) 119649103@qq.com

通讯作者: 章熙霞, (E-mail) zxx6618@sohu.com

Key words: porcine oocyte; first polar body; second polar body; survival rate

哺乳动物卵母细胞第一次减数分裂产生 1 个卵母细胞和第一极体(Pb I),第二次减数分裂产生 1 个卵母细胞和第二极体(Pb II),极体(Pb)排出后一般几小时至十几小时便退化,部分第一极体会继续分裂为 2 个小极体。之前,人们认为极体只是退化的没有生物学功能的染色质,很少有人对其进行研究,直到 1995 年,Evsikov 等^[1]发现小鼠极体可以参与受精卵发育,从而证明了极体中的染色质具有与卵母细胞中染色体一样的功能。随后,极体作为含有与卵母细胞相近遗传物质的特殊细胞,其生物学功能和利用价值得到人们的重新认识与重视。有学者利用 Pb II 和 Pb I 的遗传物质重组卵母细胞,得到能正常繁殖的小鼠后代^[2-3]。人卵母细胞 Pb I 的排出与否及其形态与卵母细胞本身的质量和发育率有关,而与能否受精无关^[4-5]。国内科学家对极体的研究起步较晚,大多是将极体作为一种生物信号或标记,而针对极体的生物学功能及如何保存与利用的研究报道很少。其中,兰宗宝等^[6]发现猪卵母细胞是否排出 Pb I 直接影响胚胎早期发育,鲍时华等^[7]发现通过小鼠卵母细胞 Pb I 的形态可预测受精卵质量。在人类医学临床实践中,极体的染色体已成功应用于人类的基因诊断,以降低遗传缺陷的发生率^[8-9]。李澎涛等^[10]发现,Pb I 与人卵母细胞的受精和发育能力有关,可根据 Pb I 的形态来预知卵母细胞的发育情况。谷瑞环等^[11]认为,根据受精后 Pb II 出现的比例可一定程度预知体外受精结果,并且发现早出现 Pb II 的卵母细胞质量或质核成熟同步化较好。刘芳等^[12]也发现,人卵母细胞受精后 3~5 h 出现 Pb II 且 18~20 h 形成 2 个原核的胚胎发育潜能较好。本研究拟对猪卵母细胞和受精卵在体外培养条件下 Pb I 和 Pb II 的排出与退化规律进行观察与判定,对其形态学以及不同保存条件下的活性进行鉴定与评价,以期对极体功能的深入研究提供优质材料。

1 材料与方法

1.1 猪卵巢和卵母细胞的采集

于生猪屠宰场挑选年龄在 6 月龄左右,体质量 95~110 kg 的杜长大或杜大长育肥猪中的未阉割母猪,摘取生产线上刚屠宰开膛后温热胴体的猪卵巢,

置于盛有生理盐水的 28~37 ℃ 保温瓶中。于 2 h 内,在无菌室用注射器抽吸直径 3~5 mm 卵泡的卵泡液,在实体显微镜下,检出有 3 层以上颗粒细胞包围的卵丘卵母细胞复合体(COCs),转移至平衡 2 h 以上的 TCM-199 液滴中,清洗 2~3 次,进行体外成熟培养(5% CO₂ 的空气,饱和湿度,39 ℃,24~72 h)。

1.2 极体的排出与采集

不同时间段取体外成熟培养的 COCs,将卵母细胞周围的颗粒细胞除去,每隔 4 h 观察一次 Pb I 的排出情况。精卵共孵育在改进型 Tris 缓冲液(mT-BM)中进行,完成后转入北卡莱罗纳州立大学-23 培养基中,每隔 4 h 观察一次 Pb II 的排出情况。Pb I 和 Pb II 的采集均采用显微操作法:选择含有 1~2 级 Pb I 和 Pb II 的卵母细胞或受精卵,以显微操作仪固定针固定卵母细胞或受精卵,用内径 20~25 μm 的拔尖去核针刺入透明带,伸入卵周隙,吸取 Pb I 和 Pb II。

1.3 极体的形态学分级和活性鉴定

Pb I 和 Pb II 的形态学评估标准参照 Ebner 等^[13]的方法进行,根据外形、胞质均匀度、膜表面平滑度和完整度分为 5 个等级。

Pb I 和 Pb II 的活性鉴定参照刘文华等^[14]的方法进行,即通过台盼蓝染色的方法进行鉴定,有活性的胞质不染色,无活性的呈蓝色。

1.4 极体的体外保存

本试验主要探讨 39 ℃、4 ℃、-20 ℃、-196 ℃ 4 种温度条件下 Pb 的保存情况。

1.4.1 常温及低温保存 根据形态分级选取含 1~2 级 Pb I 的卵母细胞和含 1~3 级 Pb II 的受精卵,放入预平衡的组织培养液-199(TCM-199)微滴培养系统中,分别在 4 ℃ 及 39 ℃ 下保存,在设定时间取部分卵母细胞或受精卵对 Pb 进行活性鉴定。

1.4.2 冷冻和超低温冷冻保存 将含有 Pb I 的卵母细胞和含有 Pb II 的受精卵装入含乙二醇 40(EG40)冷冻保护液的微管中(直径 200~300 μm),置于-20 ℃ 冰箱中冷藏或直接投入液氮(-196 ℃)中冷冻保存。在设定时间取样,解冻并对 Pb 进行活性鉴定。

1.5 数据分析

卵丘扩散率、极体排出率、保存成活率及形态学差异等数据采用 SPSS16.0 进行统计,采用多重比较检验数据的差异性。

2 结果与分析

2.1 极体的排出时间

2.1.1 Pb I 表 1 显示,体外成熟培养过程中卵丘细胞呈现不同程度的扩散,培养 32~36 h 开始排出 Pb I,培养 40 h 时卵丘细胞扩散率(86.8%)最高,Pb I 排出率(66.7%)也达到最高。培养 40~52 h,卵丘细胞慢慢脱落,扩散率有所降低。

2.1.2 Pb II 2 批 610 枚(第一批 310 枚,第二批 300 枚)受精卵培养观察结果(表 2)显示,卵母细胞受精后 4 h 就有少量的 Pb II 排出,16 h 排出量迅速

增加,20 h 的排出率(49.5%)最高,24 h 部分 Pb II 出现退化或消失,排出率开始下降。

表 1 不同培养时间 Pb I 排出率

Table 1 The excretion rate of Pb I at different culture time

培养时间 (h)	卵母 细胞数	卵丘细胞 扩散数	卵丘细胞 扩散率 (%)	Pb I 排出数	Pb I 排出率 (%)
32	230	101	43.9d	0	0
36	457	245	53.6cd	176	38.5c
40	478	415	86.8a	319	66.7a
44	416	322	77.4b	210	50.5b
48	346	220	63.6bc	185	53.5b
52	264	60	22.7e	135	51.1b

同列数据后不同小写字母表示不同处理间差异显著($P<0.05$)。

表 2 受精后不同培养时间 Pb II 排出率

Table 2 The excretion rate of Pb II at different culture time after fertilization

培养时间 (h)	批次 1		批次 2		合计	
	排出数	排出率(%)	排出数	排出率(%)	排出数	排出率(%)
4	6	1.9	9	3.0	15	2.5b
8	7	2.3	16	5.3	23	3.8b
12	12	3.9	21	7.0	33	5.4b
16	124	40.0	114	38.0	238	39.0a
20	154	49.7	145	48.3	302	49.5a
24	147	47.4	128	42.7	275	45.1a

同列数据后不同小写字母表示不同处理间差异显著($P<0.05$)。

2.2 不同排出时间极体的形态与活性

2.2.1 Pb I 表 3 显示,卵母细胞体外培养 32 h 至 36 h 开始有 Pb I 排出,并发现开始排出的 Pb I 中 1~2 级的比例(37.5%)不是很高。培养 40~44 h 排出的 Pb I 较多,其中培养 40 h 的 1~2 级的比例高达 51.7%,3

级的比例 30.7%,4~5 级的比例只有 17.6%。培养 44~52 h,1~2 级 Pb I 的比例下降,而 4~5 级的比例升高,到 52 h 时 1~2 级 Pb I 只有 14.8%。形态分级与活性鉴定结果表明,1~2 级 Pb I 大多具有生物活性,3 级 Pb I 的活性相对较差,4~5 级 Pb I 基本没有活性。

表 3 不同排出时间 Pb I 形态分级

Table 3 The morphological classes of Pb I at different excretion time

排出时间 (h)	Pb I 数量						1~2 级比例 (%)
	1 级	2 级	3 级	4 级	5 级	合计	
32	0	0	0	0	0	0	0d
36	45	21	76	34	0	176	37.5bc
40	112	53	98	56	0	319	51.7a
44	45	44	88	29	4	210	42.4ab
48	25	27	50	66	17	185	28.1c
52	2	18	34	61	20	135	14.8d

同列数据后不同小写字母表示不同处理间差异显著($P<0.05$)。

2.2.2 Pb II 表 4 显示,受精后 4~20 h 排出的 Pb II 中 1~2 级所占比例均高于 50%,受精后 24 h 1~2 级 Pb II 所占比例明显下降。其中受精后 16 h 和 20 h 排出的 Pb II 1~2 级的比例分别保持在 50.4% 和 58.9%,结合前述受精后不同时间 Pb II 的

排出率结果(受精后 20 h 排出率最高,49.5%),确定受精后 20 h 左右是猪 Pb II 最佳的采集时间。活性鉴定结果表明,Pb II 在形态与活性的相关性方面与 Pb I 一致。

表 4 受精后不同排出时间 Pb II 的形态分级

Table 4 The morphological classes of Pb II at different excretion time after fertilization

排出时间 (h)	Pb II 数量						1~2 级比例 (%)
	1 级	2 级	3 级	4 级	5 级	合计	
4	9c	5b	1c	0c	0b	15	93.3
8	11c	2b	7c	2c	1b	23	56.5
12	10c	9b	8c	4c	2b	33	57.6
16	72b	48a	68b	45b	5b	238	50.4
20	125a	53a	63b	49b	12a	302	58.9
24	58b	40a	82a	80a	15a	275	35.6

同列数据后不同小写字母表示不同处理间差异显著($P<0.05$)。

2.3 不同保存温度对极体形态与活性的影响

2.3.1 Pb I 表 5 显示,39 ℃ 下保存 2 h,Pb I 的形态正常且存活率较高,保存 4 h 时形态尚正常,但存活率显著下降,保存 6 h 形态不正常,并且存活率只有 18.2%。4 ℃ 条件保存 20~40 h,Pb I 仍然保持良好的形态与较高的存活率,但保存 60 h 时,Pb I 开始崩解或消失(形态正常率 30.5%),完全丧失活性(存活率为 0)。-20 ℃ 冷冻保存 168 h,Pb I 形态正常率为 98.3%,存活率为 95.0%。-196 ℃ 超低温冷冻保存 1 344 h,Pb I 形态正常率(97.8%)和存活率(89.1%)均保持在较高水平。

表 5 不同保存温度下 Pb I 的形态与活性

Table 5 The activity and morphology of Pb I under different temperatures

保存温度 (℃)	保存时间 (h)	形态正常率 (%)	存活率 (%)
39	2	100.0a	96.7ab
	4	100.0a	63.3d
	6	85.5b	18.2e
4	20	100.0a	98.3a
	40	95.0ab	85.0c
	60	30.5c	0
-20	24	100.0a	100.0a
	72	100.0a	100.0a
	168	98.3a	95.0ab
-196	1 344	97.8 a	89.1bc

同列数据后不同小写字母表示不同处理间差异显著($P<0.05$)。

2.3.2 Pb II 表 6 显示,受精卵中的 Pb II 在 39 ℃ 下保存 12 h 仍有 75.9% 的存活率,保存 16 h 存活率显著下降,为 34.5%。4 ℃ 下保存 30 h,Pb II 的存活率为 87.5%,保存 60 h 时,存活率仅有 8.3%,形态正常率为 25.0%。-20 ℃ 冷冻保存 240 h,Pb II 的存活率为 84.6%,保存 360 h 时,Pb II 的存活率为 69.2%,保存 480 h 时,Pb II 的存活率为 23.1%。-196 ℃ 超低温冷冻保存 1 344 h 后,Pb II 的形态正常率和存活率分别为 95.7% 和 87.0%。

3 讨论

不同哺乳动物极体的排出时间有很大差异。小鼠注射人绒毛膜促性腺激素后 12 h 得到的 Pb I 数量最多^[14],与小鼠交配后 24 h,Pb II 排出率最高,达到 79.7%^[15]。在体外成熟培养过程中,牛卵母细胞 Pb I 的排出高峰出现在 16 h,排出率为 37.0%,培养 24 h 时排出率达 74.5%^[16]。孙青原等^[17]发现,牛受精后 5 h 时 Pb II 被排出。用乙醇对体外成熟培养 26~30 h 的延边黄牛卵母细胞进行预激活(5~7 min),培养 2~3 h 后第二极体大量排出^[18]。华再东等^[19]发现,猪 COCs 培养时间不足 38 h 时,虽能看到极体,但激活后卵裂率极低,说明卵母细胞并未真正成熟。本研究中,猪卵母细胞体外培养 36 h 时出现 Pb I,40 h 排出率达 66.7%。受精后 4 h 就有少量的受精卵排出 Pb II,受精后 16 h Pb II 排出率显著增加,20 h 时达到最高。另外,本研究发现,猪

Pb I 和 Pb II 的排出时间不同,这可能与屠宰场所取卵巢周期不同以及采卵所选卵泡成熟度不一致造成卵母细胞发育不同步有关,有待进一步研究。

表 6 不同保存温度下 Pb II 的形态与活性

Table 6 The activity and morphology of Pb II under different temperatures

保存温度 (℃)	保存时间 (h)	形态正常率 (%)	存活率 (%)
39	4	100.0a	93.1ab
	8	96.7a	86.2b
	12	82.8bc	75.9c
	16	69.0d	34.5e
4	10	100.0a	100.0a
	20	100.0a	95.8ab
	30	91.6ab	87.5b
	40	83.3bc	72.9cd
	50	70.8d	66.7d
	60	25.0f	8.3g
-20	24	100.0a	92.6ab
	120	100.0a	88.5b
	240	92.3ab	84.6b
	360	76.9cd	69.2cd
-196	480	38.5e	23.1f
	1 344	95.7a	87.0b

同列数据后不同小写字母表示不同处理间差异显著($P<0.05$)。

人的 Pb I 排出后可存活 20 h^[20],而小鼠的 Pb I 排出后仅仅存活 6~12 h^[1]。刘文华等^[14]将小鼠 Pb I 第二次减数分裂中期的卵母细胞在 4.0℃、室温和 37.5℃ 下进行保存观察,发现在室温和 37.5℃ 下 Pb I 从细胞核排出后 6 h 完全失活,而在 4.0℃ 下 Pb I 排出后 12 h 存活率为 90%,排出后 48 h 存活率约为 70%。39℃ 下猪极体(包括 Pb I 和 Pb II)活性很快丧失,随着保存温度降低,其存活时间相应延长,在超低温(-196.0℃)条件下,极体的活性保持时间相对较长,保存 1 344 h 的 Pb I 和 Pb II 存活率仍保持在 89.1%和 87.0%。说明,降低卵母细胞极体在体外保存的环境温度,可有效延缓极体的退化与凋亡。同时还发现 Pb II 在 39.0℃ 下的存活时间比 Pb I 长,-196.0℃ 低温冷冻保存下 Pb I 的存活率高于 Pb II。

Pb I 和 Pb II 遗传物质的全能性已被证实并得

到公认^[21]。极体中胞质很少,主要是细胞核,因此与精子一样易于冷冻长期保存。极体的冷冻保存为哺乳动物(特别是珍稀动物)雌性种质资源的保存开辟了新途径,在猪的雌配子(卵母细胞)或受精卵的冷冻保存研究方面虽已获得成功,但猪卵母细胞脂肪含量高,所以冷冻解冻后的成活率很低。猪极体冷冻保存的成功,绕过猪卵母细胞冷冻的困难,实现了猪雌配子遗传物质的长期保存。

参考文献:

- [1] EVSIKOV A V, EVSIKOV S V. The first and second polar bodies in mouse oogenesis[J]. Ontogenez, 1995, 26(3): 196-200.
- [2] FENG Y L, HALL J L. P-050 birth of normal mice after electrofusion of the second polar body with the male pronucleus: a possible treatment for oocyte-factor infertility[J]. Fertility and Sterility, 1997, 68: S116-S117.
- [3] WAKAYAMA T, YANAGIMACHI R. The first polar body can be used for the production of normal offspring in mice[J]. Biology of Reproduction, 1998, 59(1): 100-104.
- [4] EBNER T, YAMAN C, MOSER M, et al. Prognostic value of first polar body morphology on fertilization rate and embryo quality in intracytoplasmic sperm injection[J]. Human Reproduction, 2000, 15(2): 427-430.
- [5] EBNER T, MOSER M, SOMMERGRUBER M, et al. First polar body morphology and blastocyst formation rate in ICSI patients[J]. Human Reproduction, 2002, 17(9): 2415-2418.
- [6] 兰宗宝,何若钢,莫品方,等. 猪卵母细胞第一极体排出与否对其早期胚胎发育的影响[J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2008, 33(5): 64-68.
- [7] 鲍时华,彭弋峰. 卵细胞第一极体形态与受精卵及胚胎质量关系的研究[J]. 皖南医学院学报, 2003, 22(2): 86-88.
- [8] VERLINSKY Y, GINSBERG N, LIFCHEZ A, et al. Analysis of the first polar body: preconception genetic diagnosis[J]. Human Reproduction, 1990, 5(7): 826-829.
- [9] MUNNÉ S, DAILEY T, SULTAN K M, et al. The use of first polar bodies for preimplantation diagnosis of aneuploidy[J]. MHR: Basic Science of Reproductive Medicine, 1995, 1(2): 94-100.
- [10] 李澎涛,王 娜,殷晨星,等. 卵母细胞第一极体形态对受精结局的影响[J]. 广东医学, 2016, 37(24): 3732-3734.
- [11] 谷瑞环,孙贻娟,陆小波,等. 第二极体排出时间在预测体外受精结局中的价值[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2011, 5(14): 4127-4132.
- [12] 刘 芳,王 莹,金 锐,等. 常规 IVF 短时授精第 2 极体排出及原核形成与胚胎发育潜能的相关性研究[J]. 宁夏医学杂志, 2013, 35(9): 799-802.
- [13] EBNER T, MOSER M, YAMAN C, et al. Elective transfer of embryos selected on the basis of first polar body morphology is associated with increased rates of implantation and pregnancy[J]. Fertil-

- ity and Sterility, 1999, 72(4): 599-603.
- [14] 刘文华,孙洁,王公金,等.小鼠卵母细胞第一极体的采集与保存[J].江苏农业学报,2006,22(1):42-45.
- [15] 张世生.小鼠第二极体发育潜力研究[D].重庆:西南农业大学,2004.
- [16] PARK Y S, KIM S S, KIM J M, et al. The effects of duration of *in vitro* maturation of bovine oocytes on subsequent development, quality and transfer of embryos[J]. Theriogenology, 2005, 64(1): 123-134.
- [17] 孙青原,秦鹏春,刘国艺,等.牛体外授精的程序及超微结构研究[J].动物学报,1996,42(3):303-308.
- [18] 林涛,李晓霞,刁云飞,等.延边黄牛卵母细胞激活后第二极体排出的研究[J].畜牧与兽医,2008,40(8):50-52.
- [19] 华再东,郑新民,魏庆信,等.猪分级卵母细胞体外成熟时间规律的研究[J].中国畜牧兽医,2011,38(3):155-159.
- [20] ORTIZ M E, LUCERO P, CROXATTO H B. Postovulatory aging of human ova: II. spontaneous division of the first polar body[J]. Molecular Reproduction and Development, 1983, 7(3): 269-276.
- [21] 范必勤.哺乳动物第一和第二极体的研究[J].农业生物技术学报,2000,8(2):103-105.

(责任编辑:王妮)