

# 生理浓度氨基酸对猪卵母细胞体外成熟及孤雌胚胎发育的影响

郭润发<sup>1,2</sup> 宋玉然<sup>2</sup> 海棠<sup>2</sup> 周琪<sup>2</sup> 周佳勃<sup>1</sup>

(1. 东北农业大学 生命科学学院 哈尔滨 150030; 2. 中国科学院 动物研究所干细胞与生殖生物学国家重点实验室 北京 100101)

中图分类号: S828; S814

文献标识码: B

文章编号: 1004-7034(2017)06-0110-03

DOI:10.13881/j.cnki.hljxmsy.2017.1158

猪作为模式动物由来已久,相比小鼠等模式生物在生理学、解剖学和疾病发生机理等方面都与人类极为相似,使其比其他动物模型在生物和医学研究领域都具有更为重要的研究和应用价值。体外成熟卵母细胞是进行转基因猪、克隆猪等研究的重要支持,卵母细胞的质量和胚胎发育能力密切相关。但是猪的体外成熟卵母细胞在成熟和受精的能力上都比体内差,这说明体外成熟环境与体内生理环境下存在较大差异<sup>[1]</sup>。随着科学技术手段的发展,研究人员发现在猪的卵泡液中包含激素、脂肪酸、氨基酸和多种生长因子等物质,这些物质为卵母细胞的成熟发育营造一个特殊的微环境,使其能得到充分的营养支持和保护。在体外培养中提供这些物质的主要是通过培养液,而不同氨基酸在培养液和体内环境下的卵泡液和输卵管液含量也不同,通过高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)分析技术可以客观可靠地比较不同氨基酸在卵泡液和培养液中的差异。试验选取2种在不同液体中差异较大的氨基酸,即丙氨酸(Ala)和牛磺酸(Tau),通过在卵母细胞成熟和胚胎发育阶段培养液中添加Ala和Tau研究这两种氨基酸对猪卵母细胞成熟和发育的影响。

## 1 材料

### 1.1 试剂和成熟培养液的配制

TCM199粉末,Invitrogen(美国)公司生产;其余化学药品,均由Sigma公司生产;恒温培养箱,Thermo Scientific公司生产。

猪卵母细胞成熟液的配制:先量取300~400 mL去离子水加入烧杯中,称取1 g聚乙烯醇(PVA)置于烧杯中,加热沸腾1.5~2.0 h直至PVA全部溶解,待液体温度回到室温后再按TCM199配制说明加入

TCM199和NaHCO<sub>3</sub>。待全部溶解后加入3.05 mmol/L D-谷氨酰胺,0.91 mmol/L丙酮酸钠,50 μg/mL链霉素和75 μg/mL青霉素G。待使用前添加0.57 mmol/L半胱氨酸,0.5 μg/mL黄体生成素(LH),0.5 μg/mL卵泡刺激素(FSH),10 ng/mL胰岛素样生长因子(IGF)和10%卵泡液,定容至1 L并过滤。

PZM3胚胎培养液的配制:量取50 mL去离子水,加入3 mg/mL牛血清白蛋白,108 mmol/L NaCl,10 mmol/L KCl,0.35 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,0.4 mmol/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O,25.07 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>,0.2 mmol/L Na-pyruvate,2 mmol/L Ca-(Lactate)<sub>2</sub>·5H<sub>2</sub>O,1 mmol/L L-谷氨酰胺,5 mmol/L亚牛磺酸,待牛血清白蛋白溶解后加入20 mL/L β-巯基乙醇(BME)和10 mL/L非必需氨基酸(MEN)后定容至100 mL并过滤。

操作液为4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)缓冲液。激活液为含有0.3 mmol/L Mannitol,1 mmol/L CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O和0.1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O的HEPES缓冲液。将成熟液和PZM3胚胎培养液预先加入四孔板中并覆盖石蜡油,放置在含5% CO<sub>2</sub>的饱和湿度、39℃恒温培养箱中平衡并预热至少12 h。HEPES和激活液使用前放于不含CO<sub>2</sub>的恒温箱中预热4 h以上。

### 1.2 猪卵巢

猪卵巢,来源于北京市第五肉联场,储存于30℃左右生理盐水中迅速运回实验室。

## 2 方法

### 2.1 卵母细胞的成熟培养

通过使用带有16号注射针头的收集管连接真空吸液泵抽取猪卵巢上直径为2~8 mm的卵泡中的卵泡液,从而收集卵母细胞。将抽取的卵泡液加入预热的HEPES中,稀释后39℃静置3 min以充分沉淀后弃上清液,再加入HEPES。重复此过程2~3次后将沉淀移入平皿中,体视镜下使用口吸管捡取覆盖3层

收稿日期:2016-03-31;修回日期:2017-02-13

作者简介:郭润发(1988-),男,硕士研究生,研究方向为发育生物学,guorun\_fa@163.com。

通信作者:周佳勃(1974-),男,副教授,博士,研究方向为发育生物学,chowjb@163.com。

以上卵丘细胞的卵丘-卵母细胞复合体。将收集到的卵母细胞使用成熟培养液洗3~4次,按每500 μL成熟培养液50枚卵放入24孔板中1孔进行培养,在含5% CO<sub>2</sub>的饱和湿度39℃恒温培养箱中培养42 h。然后将培养的卵丘-卵母细胞复合体加入含0.1%透明质酸酶的HEPES中吹打3 min后使用PZM3洗3次,挑取已排出第一极体的第二次减数分裂中期(M II)卵母细胞。

2.2 卵母细胞的激活和体外培养

将挑出的成熟M II卵母细胞放入PZM3滴中待用,每次吸取15~30枚M II卵母细胞先在激活液中洗2次,然后移入加入激活液融合槽的两电极之间,卵母细胞交错排列。给予电激活,120 V、100 μs的直流电刺激间隔30 ms 2次。激活后使用PZM3培养液洗2~3次后按每孔30枚放入PZM3培养液中培

养,PZM3已预先覆盖石蜡油并在含5% CO<sub>2</sub>的饱和湿度39℃恒温培养箱中平衡过12 h。培养24 h后统计卵裂率,140 h后统计囊胚率。

2.3 数据的统计分析

试验数据采用SPSS 18.0统计软件进行分析。数据先经过LSD转换然后进行单一因素方差分析。所有试验重复3次以上。

3 结果与分析

3.1 卵母细胞成熟阶段加入生理浓度的Ala、Tau对卵母细胞成熟以及后续孤雌胚胎发育的影响

通过高效液相色谱分别获得卵泡液中的Ala和Tau的浓度,卵泡液中的Ala浓度为125 mg/L,Tau浓度为450 mg/L,通过在成熟液中添加额外的Ala和Tau模拟生理浓度比较两组之间的差别,结果见表1、图1。

表1 生理浓度Ala、Tau对猪卵母细胞成熟和后续孤雌胚胎发育的影响

项目	培养卵母细胞数/个	成熟卵母细胞数/个	成熟率/%	培养胚胎数/枚	2-细胞数/个	2-细胞率/%	囊胚数/个	囊胚率/%	囊胚细胞数/个
对照组	400	240	60.0	226	200	88.5	57	25.2	27.3 <sup>a</sup>
Ala生理浓度(125 mg·L <sup>-1</sup> )	400	246	61.5	226	203	89.8	54	23.9	36.3 <sup>ab</sup>
Tau生理浓度(450 mg·L <sup>-1</sup> )	389	241	62.0	225	210	93.3	63	28.0	40.9 <sup>b</sup>

注:同列数据肩标字母完全不同表示差异显著(P<0.05),含相同字母表示差异不显著(P>0.05)。

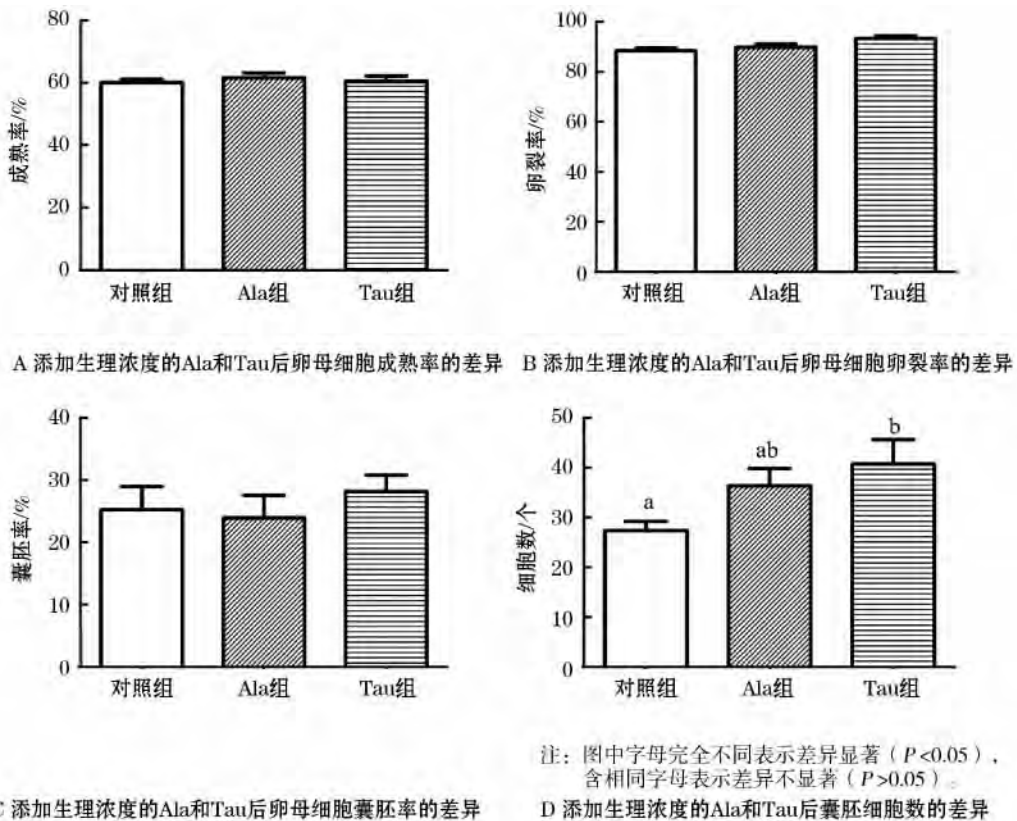


图1 在卵母细胞体外成熟阶段添加Ala和Tau对卵母细胞成熟和后续孤雌胚胎发育的影响

由图1可知,在卵母细胞成熟培养阶段(IVM)加

入生理浓度的Ala或Tau,对卵母细胞成熟率以及后

续孤雌胚胎的卵裂率和囊胚率均无显著影响 ( $P > 0.05$ ) ,但对囊胚细胞数有显著提高 ( $P < 0.05$ ) 。

### 3.2 在猪孤雌胚胎体外培养阶段加入不同浓度 Ala 对猪胚胎发育的影响

通过液相色谱分别测定 PZM3 中的 Ala 和 Tau 浓度 ,Ala 浓度在 PZM3 中为 8.38 mg/L ,Tau 浓度在 PZM3 中为 15.95 mg/L。为研究 Ala 对猪卵母细胞体外培养阶段的作用 ,在 PZM3 培养基中分别添加 47.86、125、300 mg/L 的 Ala 用于猪卵母细胞的体外培养 ,分别统计卵裂率、囊胚率、囊胚细胞数 ,结果见表 2。

表 2 不同浓度梯度 Ala 对猪孤雌胚胎发育的影响

Ala 浓度/ (mg · L <sup>-1</sup> )	胚胎 数/枚	卵裂 数/个	卵裂 率/%	囊胚 数/个	囊胚 率/%	囊胚细 胞数/个
8.38	130	112	86.20	29	22.3	30.70
47	130	116	89.20	25	19.2	30.70
86	130	112	86.20	27	20.8	21.80
125	130	115	88.46	22	16.9	23.75
300	130	111	85.38	22	16.9	29.40

为研究 Tau 对猪卵母细胞体外培养阶段的作用 ,在 PZM3 培养基中分别添加 45、75、115、450 mg/L 的 Tau 用于猪卵母细胞的体外培养 ,分别统计卵裂率、囊胚率、囊胚细胞数 ,结果见表 3。

表 3 不同浓度梯度 Tau 对猪孤雌胚胎发育的影响

Tau 浓度/ (mg · L <sup>-1</sup> )	胚胎 数/枚	卵裂 数/个	卵裂 率/%	囊胚 数/个	囊胚 率/%	囊胚细 胞数/个
15.95	220	200	90.9	48	21.8	25.00
45	220	202	91.8	51	23.2	29.40
75	220	204	92.7	43	19.5	26.65
115	220	198	90.0	52	23.6	28.50
450	220	203	92.3	47	21.4	25.00

由表 2、表 3 可知 ,通过在体外培养阶段添加各浓度梯度的 Ala 和 Tau 对猪孤雌胚胎的发育无显著影响 ( $P > 0.05$ ) 。

## 4 讨论

20 世纪 60 年代 ,研究人员开始关注于研究哺乳动物卵母细胞体外培养体系的化学成分 ,提高哺乳动物卵母细胞体外成熟和发育能力一直是胚胎工程研究的一个重要方向。随着研究的进展 ,氨基酸对胚胎发育的影响越来越受到人们的关注。F. Devreker 等<sup>[2]</sup> 研究表明 ,通过在胚胎培养体系中添加氨基酸可以使人的受精卵囊胚率明显提高。L. J. VanWinkle<sup>[3]</sup> 研究表明 ,非必需氨基酸可以促进受精卵卵裂 ,而必需氨基酸则在卵裂到 8 - 细胞期的发育中起重

要作用。猪的体外成熟卵母细胞在成熟和受精的能力上都比体内差 ,这说明体外成熟环境与体内存在较大差异 ,通过比较卵泡液和卵母细胞成熟培养液中氨基酸的差异 ,选择 Ala 和 Tau 添加到培养液中发现 ,在卵母细胞成熟率、卵裂率和囊胚率上没有显著差别 ( $P > 0.05$ ) ,但是单独添加生理浓度的 Ala 和 Tau 都可以提高囊胚细胞数 ,说明在卵母细胞成熟过程中需要 Ala 和 Tau 支持。原因可能是卵母细胞成熟过程中会产生活性氧簇 (ROS) ,ROS 的存在可能对胚胎发育有害<sup>[4]</sup> ,而 Tau 作为抗氧化剂可有效降低这种伤害 ,进而对胚胎发育更为有利<sup>[5]</sup> 。而对于丙氨酸对胚胎发育影响的文献报道较少 ,有文献报道在不同物种的生殖道中丙氨酸都具有较高的浓度<sup>[6]</sup> ,研究认为丙氨酸会参与细胞内 pH 值的调节 ,保护胚胎渗透压的稳定<sup>[7]</sup> ,并参与代谢途径的最终产物氨的降解<sup>[8]</sup> 。随后试验研究在孤雌胚胎培养到囊胚阶段添加生理浓度的 Ala 和 Tau ,观察其对囊胚发育的影响发现 ,Ala 和 Tau 在发育到囊胚的过程中对孤雌胚胎的卵裂率、囊胚率和囊胚细胞数都没有产生影响 ,说明 Ala 和 Tau 对胚胎发育的影响主要集中于早期卵母细胞成熟过程。

## 5 结论

在培养液中添加 Ala 和 Tau ,可以提高体外成熟猪卵母细胞的质量。猪胚胎培养阶段可以不用额外添加 Ala 和 Tau ,对胚胎发育并无影响。

## 参考文献:

- [1] SUN Q Y , NAGAI T. Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation and fertilization [J]. J Reprod Dev , 2003 , 49( 5) : 347 - 359.
- [2] DEVREKER F , HARDY K , Van Den BERGH M , et al. Amino acids promote human blastocyst development in vitro [J]. Hum Reprod , 2001 , 16( 4) : 749 - 756.
- [3] Van WINKLE L J. Amino acid transport regulation and early embryo development [J]. Biol Reprod , 2001 , 64( 1) : 1 - 12.
- [4] BLONDIN P , COENEN K , SIRARD M A. The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation [J]. J Androl , 1997 , 18( 4) : 454 - 460.
- [5] GUYADER - JOLY C , PONCHON S , HEYMAN Y , et al. Effect of hypotaurine on development of in vitro - derived bovine embryos [J]. Theriogenology , 1998( 49) : 201.
- [6] HUGENTOBLE S A , DISKIN M G , LEESE H J , et al. Amino acids in oviduct and uterine fluid and blood plasma during the estrous cycle in the bovine [J]. Mol Reprod Dev , 2007 , 74( 4) : 445 - 454.
- [7] BAVISTER B D , LEIBFRIED M L , LIEBERMAN G. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium [J]. Biol Reprod , 1983 , 28( 1) : 235 - 247.
- [8] Van WINKLE L J , DICKINSON H R. Differences in amino acid content of preimplantation mouse embryos that develop in vitro versus in vivo: in vitro effects of five amino acids that are abundant in oviductal secretions [J]. Biol Reprod , 1995 , 52( 1) : 96 - 104. ( 015)