

# 生长激素和胰岛素对猪卵母细胞体外成熟及卵裂的影响

王 星<sup>1,2</sup>, 罗光彬<sup>2</sup>, 刘 永<sup>2</sup>, 姜午旗<sup>2</sup>

(1. 辽东学院 农学院, 辽宁 丹东 118003; 2. 沈阳农业大学 畜牧兽医学院, 辽宁 沈阳 110161)

**摘要:** 研究了生长激素(STH)、胰岛素(insulin)单独或者联合作用对猪卵母细胞体外成熟及孤雌激活后卵裂的影响。结果表明: STH、胰岛素对卵母细胞体外成熟及孤雌激活后卵裂呈现双重效应。在mNCSU-23基础液中添加0.15 $\mu$ g/mL STH组的成熟率和卵裂率显著高于对照组及0.01, 0.05, 0.1, 2 $\mu$ g/mL组( $P < 0.05$ ); 添加5 $\mu$ g/mL, 8 $\mu$ g/mL胰岛素组的成熟率显著高于对照组及0.5, 2, 10 $\mu$ g/mL组; 添加5 $\mu$ g/mL胰岛素的卵裂率也显著高于对照组及0.5, 2, 8, 10 $\mu$ g/mL组; 0.15 $\mu$ g/mL STH与2 $\mu$ g/mL胰岛素联合添加组的成熟率和卵裂率最高, 同其他组相比, 差异显著。

**关键词:** 生长激素; 胰岛素; 猪; 卵母细胞; 体外成熟; 卵裂

**中图分类号:** S814.8      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1004-3268(2009)01-0100-04

## Effects of STH and Insulin on Porcine *in vitro* Oocyte Maturation and Oocyte Cleavage

WANG Xing<sup>1,2</sup>, LUO Guang-bin<sup>2</sup>, LIU Yong<sup>2</sup>, JIANG Wu-qi<sup>2</sup>

(1. Agricultural Department of Liaodong University, Dandong 118003, China; 2. College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

**Abstract:** In this study, the effects of STH and insulin on porcine *in vitro* oocyte maturation and cleavage after parthenogenetic activation were investigated. The results showed that STH and insulin had double effects on oocyte maturation and cleavage. The maturation and the cleavage rates of the oocytes matured in mNCSU-23 medium supplemented with 0.15 $\mu$ g/mL STH were significantly higher than that of control and the other tested groups which supplemented with 0.01, 0.05, 0.1, 2 $\mu$ g/mL STH ( $P < 0.05$ ). The maturation and cleavage rates of the oocytes matured in medium supplemented with 5 $\mu$ g/mL insulin was also higher than other group. However, both of the maturation and cleavage rates of the oocytes matured in medium supplemented with 2 $\mu$ g/mL insulin and 0.15 $\mu$ g/mL STH was significantly higher than that of other groups ( $P < 0.05$ ), which represented the optimal condition for *in vitro* maturation of porcine oocytes.

**Key words:** STH; Insulin; Porcine; Oocyte; *In vitro* maturation; Oocyte cleavage

卵母细胞体外成熟(IVM)可以为采用体细胞核移植方法生产大型转基因动物的研究提供大量的

M II期卵母细胞。猪卵丘-卵母细胞复合体(COCs)在体外培养过程中受到多种因素的影响。

收稿日期: 2008-10-12

基金项目: 辽东学院青年科研基金资助项目(2007Y22)

作者简介: 王 星(1972-), 男, 辽宁丹东人, 讲师, 在读博士研究生, 研究方向: 动物胚胎工程。

通讯作者: 罗光彬(1959-), 男, 吉林磐石人, 教授, 博士, 主要从事动物胚胎工程方面的研究。

生长激素(STH)是由垂体前叶生长激素细胞所分泌的一种肽类激素,为机体生长所必需,在卵泡的募集和卵母细胞生长的启动方面具有重要作用<sup>[1]</sup>。研究表明,STH可显著提高人小腔卵泡卵母细胞的生发泡数量,并可显著提高其体外成熟率和受精率<sup>[2]</sup>。胰岛素(insulin)是小分子蛋白质,在体内主要调节代谢过程。最近研究表明,在猪的卵母细胞培养液中添加一定量的胰岛素和 $17\beta\text{-E}_2$ 有助于提高卵母细胞的成熟率和卵裂率<sup>[3]</sup>。而且,胰岛素还能促进体外受精早期胚胎的发育<sup>[4]</sup>。但猪卵母细胞体外培养液中,2种激素联合添加目前尚无报道。鉴此,探讨生长激素与胰岛素对猪卵母细胞体外成熟及卵裂的影响,确定其最佳添加剂量,以优化培养条件,为体细胞核移植技术生产转基因克隆猪提供大量优质的卵母细胞,从而提高体细胞克隆猪的成功率。

## 1 材料和方法

### 1.1 卵巢的采集与保存

猪卵巢采集于沈阳东生屠宰厂。猪屠宰剖腹后,立即无菌采集卵巢,去除卵巢表面的结缔组织、脂肪和附着的输卵管;将卵巢保存在装有 $35\sim 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 生理盐水的保温瓶中,2h内送回实验室。

### 1.2 猪COCs的收集与成熟培养

卵巢运回实验室后,用无菌生理盐水清洗3次。用带12号针头的10mL一次性注射器抽取卵巢表面直径 $2\sim 5\text{ mm}$ 的卵泡内COCs。在体视显微镜下,检出具有3层以上致密卵丘细胞层及均匀细胞质的COCs进行培养。

卵母细胞培养采用微滴法,每个微滴 $50\mu\text{L}$ ,覆盖矿物油;在 $\text{CO}_2$ 培养箱内平衡2h以上。采集的COCs用杜氏磷酸盐缓冲液(DPBS)洗3次,然后用成熟培养液洗3次,移入已平衡好的培养滴中,每滴放COCs $10\sim 20$ 枚,在 $38.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $5\%\text{ CO}_2(\text{V/V})$ ,饱和湿度条件下培养。

成熟培养液为改良NCSU-23(mNCSU-23),其中添加有 $1.1\text{ mg/mL}$ 亚牛磺酸、 $10\%$ 猪卵泡液(PFF)、 $10\text{ IU/mL}$  PMSG(宁波激素厂,产品批号070111)、 $10\text{ IU/mL}$  hCG(宁波激素厂,产品批号070128)、 $100\text{ U/mL}$ 青霉素和 $100\mu\text{g/mL}$ 链霉素。 $0.22\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。试验所用试剂如无特殊说明,均购自Sigma公司。

pFF制备:用10mL一次性注射器,抽取卵巢表面直径大于 $6\text{ mm}$ 卵泡中的卵泡液, $3000\text{ r/min}$ 离心 $30\text{ min}$ ;然后用 $0.22\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌,分

装, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

### 1.3 卵母细胞成熟鉴定

COCs培养44h后,移入 $0.1\%$ 透明质酸酶液中处理 $2\sim 3\text{ min}$ ;将卵丘细胞去净,卵母细胞在 $4\times 10$ 倍实体显微镜下观察第一极体是否存在;以第一极体排出作为卵母细胞成熟的标准,用于卵母细胞的孤雌激活。胞质破裂、核结构消失或结构损伤的卵母细胞归于死亡或退化。

### 1.4 成熟卵母细胞孤雌激活及培养

卵母细胞成熟后脱去卵丘细胞并移入DPBS中洗涤,挑选胞质均匀的卵子用于电激活。激活液为 $0.3\text{ mol/L}$ 甘露醇,其中添加 $0.05\text{ mmol/L}$   $\text{CaCl}_2$ , $0.01\text{ mmol/L}$   $\text{MgCl}_2$ 。卵子用电场强度为 $130\text{ V/mm}$ ,脉冲时程为 $80\mu\text{s}$ 的一次脉冲激活,每次激活前更换电融合仪小室内的激活液。激活后洗涤卵子并立即移入含 $7.5\text{ mg/L}$ 细胞松弛素B(CB)、 $10\text{ mg/L}$ 放线菌酮(CHX)和 $4\text{ g/L}$ BSA的NCSU-23中培养4h,然后移入无CB和CHX的NCSU-23中培养。每滴 $10\sim 15$ 枚卵子,上盖矿物油,培养条件为 $38.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $5\%\text{ CO}_2(\text{V/V})$ ,饱和湿度。培养液在放入卵子之前在培养箱中预平衡2h。激活后 $44\sim 48\text{ h}$ 观察卵裂。

### 1.5 试验设计

试验1分6组,对照组为mNCSU-23。试验组在对照组基础上分别添加 $0.01, 0.05, 0.1, 0.15, 2\mu\text{g/mL}$ 生长激素,成熟培养44h。COCs用 $0.1\%$ 透明质酸酶消化 $2\text{ min}$ ,涡动搅拌器上振荡,去除卵丘细胞后用于卵母细胞成熟鉴定和电激活,5次重复。

试验2分6组,对照组为mNCSU-23。试验组在对照组基础上分别添加 $0.5, 2, 5, 8, 10\mu\text{g/mL}$ 胰岛素,成熟培养44h。COCs去除卵丘细胞后用于卵母细胞成熟鉴定和电激活,5次重复。

试验3分5组,对照组为mNCSU-23+ $0.15\mu\text{g/mL}$ STH。试验组在对照组基础上分别添加 $0.5, 2, 5, 8\mu\text{g/mL}$ 胰岛素,成熟培养44h。COCs去除卵丘细胞后用于卵母细胞成熟鉴定和电激活,4次重复。

试验4分5组,对照组为NCSU-23+ $5\mu\text{g/mL}$ 胰岛素;试验组在对照组基础上分别添加 $0.01, 0.05, 0.1, 0.15\mu\text{g/mL}$ STH,成熟培养44h。COCs去除卵丘细胞后用于卵母细胞成熟鉴定和电激活,4次重复。

1.6 数据分析

所得数据采用 SPSS12.0 统计软件进行显著性检验。对成熟率、卵裂率进行单因素方差分析,多重比较用邓肯氏法。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 STH 对猪卵母细胞体外成熟和卵裂的影响

mNCSU-23 培养液中添加不同浓度的 STH,对猪卵母细胞体外成熟和卵裂表现为双重效应。当 STH 的浓度在 0.01~0.15 $\mu$ g/mL 时,能促进卵母细胞的成熟和孤雌激活后的卵裂,呈现浓度依赖性。同其他试验组和对照组相比,添加 0.15 $\mu$ g/mL

STH 显著提高了成熟率和卵裂率。当 STH 的浓度继续增加到 2 $\mu$ g/mL STH 时,与添加 0.15 $\mu$ g/mL 的 STH 相比,成熟率和卵裂率显著下降(表 1)。

2.2 不同浓度胰岛素对猪卵母细胞体外成熟和卵裂的影响

mNCSU-23 培养液中添加不同浓度的胰岛素,对猪卵母细胞成熟和卵裂表现为双重效应。同其他试验组和对照组相比,添加 5 $\mu$ g/mL 和 8 $\mu$ g/mL 胰岛素组的成熟率显著提高。当胰岛素的浓度继续增加,成熟率和卵裂率呈下降趋势。同其他试验组和对照组相比,添加 5 $\mu$ g/mL 胰岛素组的卵裂率显著提高(表 2)。

表 1 不同浓度的 STH 对猪卵母细胞体外成熟和卵裂的影响

处理	检查卵数	44h 成熟率(%)	激活卵数	48h 卵裂率(%)
mNCSU-23	263	51.75 $\pm$ 3.77 cC	106	43.04 $\pm$ 1.86 cB
mNCSU-23+0.01 $\mu$ g/mL STH	248	53.45 $\pm$ 2.44 cC	103	41.18 $\pm$ 2.49 cB
mNCSU-23+0.05 $\mu$ g/mL STH	206	57.09 $\pm$ 2.65 cAB	107	42.98 $\pm$ 1.70 cB
mNCSU-23+0.1 $\mu$ g/mL STH	202	66.48 $\pm$ 1.64 bAB	182	57.52 $\pm$ 1.17 bA
mNCSU-23+0.15 $\mu$ g/mL STH	202	73.83 $\pm$ 1.80 aA	131	64.76 $\pm$ 2.84 aA
mNCSU-23+2 $\mu$ g/mL STH	217	50.43 $\pm$ 2.63 cC	123	43.92 $\pm$ 1.86 cB

注:同列不同小写字母表示差异显著(P<0.05),不同大写字母表示差异极显著(P<0.01),下同

表 2 不同浓度胰岛素对猪卵母细胞体外成熟和卵裂的影响

处理	检查卵数	44h 成熟率(%)	激活卵数	48h 卵裂率(%)
mNCSU-23	263	51.75 $\pm$ 3.77b	106	43.04 $\pm$ 1.86 cC
mNCSU-23+0.5 $\mu$ g/mL 胰岛素	220	56.48 $\pm$ 3.11b	96	46.05 $\pm$ 3.69 cC
mNCSU-23+2 $\mu$ g/mL 胰岛素	207	56.10 $\pm$ 2.31b	96	46.72 $\pm$ 3.02 bc
mNCSU-23+5 $\mu$ g/mL 胰岛素	178	66.25 $\pm$ 1.34a	99	61.63 $\pm$ 2.92 aA
mNCSU-23+8 $\mu$ g/mL 胰岛素	203	60.64 $\pm$ 1.64a	98	54.01 $\pm$ 1.70 bAB
mNCSU-23+10 $\mu$ g/mL 胰岛素	227	53.64 $\pm$ 3.73b	96	44.83 $\pm$ 3.59 cBC

2.3 STH、胰岛素联合添加对猪卵母细胞体外成熟和卵裂的影响

将卵母细胞分别培养于 STH,STH 与胰岛素联用培养液中,和对照组相比,都能促进卵母细胞的成熟,且差异显著。在试验组中,0.15 $\mu$ g/mL STH

与 2 $\mu$ g/mL 胰岛素联用效果最好,成熟率和卵裂率最高;同对照组相比,差异显著(表 3)。

培养液添加 5 $\mu$ g/mL 胰岛素和 0.05 $\mu$ g/mL STH 的情况下,卵母细胞体外成熟率和卵裂率最高(表 4)。

表 3 STH 与不同浓度的胰岛素联合添加对猪卵母细胞体外成熟和卵裂的影响

处理	检查卵数	44h 成熟率(%)	激活卵数	48h 卵裂率(%)
mNCSU-23+0.15 $\mu$ g/mL STH	145	61.20 $\pm$ 1.67 cB	78	48.60 $\pm$ 2.25 cB
mNCSU-23+0.15 $\mu$ g/mL STH+0.5 $\mu$ g/mL 胰岛素	158	71.47 $\pm$ 1.53 bA	79	62.10 $\pm$ 2.93 bA
mNCSU-23+0.15 $\mu$ g/mL STH+2 $\mu$ g/mL 胰岛素	149	79.37 $\pm$ 2.10 aA	84	72.31 $\pm$ 1.20 aA
mNCSU-23+0.15 $\mu$ g/mL STH+5 $\mu$ g/mL 胰岛素	104	47.41 $\pm$ 2.83 dC	86	38.93 $\pm$ 3.25 dBC
mNCSU-23+0.15 $\mu$ g/mL STH+8 $\mu$ g/mL 胰岛素	137	47.71 $\pm$ 2.20 dC	85	33.95 $\pm$ 3.28 dC

表 4 胰岛素与不同浓度的 STH 联合添加对猪卵母细胞体外成熟和卵裂的影响

处理	检查卵数	44 h 成熟率(%)	激活卵数	48 h 卵裂率(%)
mNCSU-23+ 5 $\mu$ g/ mL 胰岛素	144	61. 33 $\pm$ 3. 64a	81	58. 62 $\pm$ 4. 18a
mNCSU-23+ 5 $\mu$ g/ mL 胰岛素+ 0. 01 $\mu$ g/ mL STH	156	59. 23 $\pm$ 5. 11a	80	56. 50 $\pm$ 5. 04ab
mNCSU-23+ 5 $\mu$ g/ mL 胰岛素+ 0. 05 $\mu$ g/ mL STH	151	67. 90 $\pm$ 2. 93a	78	64. 07 $\pm$ 4. 32a
mNCSU-23+ 5 $\mu$ g/ mL 胰岛素+ 0. 10 $\mu$ g/ mL STH	156	46. 07 $\pm$ 5. 10b	79	43. 15 $\pm$ 5. 16bc
mNCSU-23+ 5 $\mu$ g/ mL 胰岛素+ 0. 15 $\mu$ g/ mL STH	155	33. 49 $\pm$ 3. 63b	79	30. 39 $\pm$ 3. 56c

3 讨论

试验发现,STH 和胰岛素对猪卵母细胞的成熟具有双重作用,添加适宜浓度的 STH 和胰岛素对卵母细胞成熟具有促进作用,高浓度的 STH 和胰岛素对卵母细胞的成熟有抑制作用。添加 0. 15 $\mu$ g/ mL STH 组的卵母细胞成熟率和卵裂率显著高于对照组,添加 5 $\mu$ g/ mL 胰岛素组的成熟率、卵裂率显著高于对照组。0. 15 $\mu$ g/ mL STH 与 2 $\mu$ g/ mL 胰岛素联合添加组的成熟率和卵裂率最高,同其他组相比,差异显著,为猪卵母细胞体外成熟的最佳条件。

作为一种肽类激素,STH 在机体生长过程中是必需的。有研究表明,重组生长激素虽然有利于细胞的生长,但较高浓度的重组生长激素却对细胞的生长有抑制作用;添加低浓度的 STH 有利于细胞的体外培养<sup>[3]</sup>,与本试验结果一致。试验研究了猪卵母细胞孤雌激活后卵裂的情况,卵裂也是卵母细胞胞质成熟好坏的一个初步判定条件。研究发现,适当浓度的 2 种激素不仅能促进卵母细胞的成熟,而且能提高卵母细胞激活后的卵裂率,说明其对于猪卵母细胞胞质的成熟有促进作用。研究表明,卵丘形态和卵丘扩展影响卵母细胞成熟<sup>[6]</sup>。在卵母细胞体外成熟的过程中,多种动物 COCs 的卵丘细胞存在着凋亡的现象<sup>[7,8]</sup>,STH 可明显促进卵丘细胞扩展,抑制卵丘细胞凋亡<sup>[9]</sup>,胰岛素也可作为细胞凋亡的抑制剂<sup>[10]</sup>。由于卵丘细胞与卵母细胞结构与功能有密切的联系,卵丘扩展及卵丘细胞层数与卵母细胞体外成熟存在密切的联系<sup>[11,12]</sup>。在试验猪卵母细胞体外成熟培养液中添加适量的 STH、胰岛素,是否通过抑制卵丘细胞的凋亡来提高卵母细胞的成熟率和孤雌激活后的卵裂率,以及其作用机制等,有待进一步研究。

参考文献:

[ 1 ] 吴志南,丁利军,程文佳,等.生长激素在雌性动物生殖中的作用[ J ].黑龙江动物繁殖,2004,13(2):15—16.

[ 2 ] Hassan A Y, Hossam A, Ashraf A R, *et al.* Effects of growth hormone on *in vitro* maturation of germinal vesicle of human oocytes retrieved from small antral follicles[ J ]. Rep Rod Gen, 2001, 18(8): 417—420.

[ 3 ] 杨喜,王志刚,刘丑生,等.猪卵母细胞的体外成熟影响因素的研究[ J ].中国畜牧兽医,2007,34(3):74—76.

[ 4 ] 叶丹娜,胡惠忠,杜挺媛,等.胰岛素和葡萄糖对水牛体外受精时期胚胎发育的影响[ J ].广西农业生物科学,2006,25(9):50—55.

[ 5 ] 陈晓宇,刘东,李青旺.猪卵巢卵母细胞的收集和体外成熟培养[ J ].上海农业学报,2003,19(2):75—78.

[ 6 ] 岳顺利,周佳勃,严云勤,等.卵丘在卵母细胞成熟中的作用[ J ].细胞生物学杂志,2005,27(4):403—406.

[ 7 ] Paola Pocar, Daniela Nestler, Michaela Risch, *et al.* Apoptosis in bovine cumulus-oocyte complexes after exposure to polychlorinated biphenyl mixtures during *in vitro* maturation[ J ]. Reproduction, 2005, 130: 857—868.

[ 8 ] Ikeda S, Imai H, Yamada M. Apoptosis in cumulus cells during *in vitro* maturation of bovine cumulus-enclosed oocytes[ J ]. Reproduction, 2003, 125: 369—376.

[ 9 ] Sabine Kolle, Miodrag Stojkovic, Gudrun Boie, *et al.* Growth hormone-related effects on apoptosis, mitosis and expression of connexin 43 in bovine *in vitro* maturation cumulus-oocyte complexes[ J ]. Biology of Reproduction, 2003, 68: 1584—1589.

[ 10 ] Emilia Markstrom, Eva Ch Svensson, Ruijin Shao, *et al.* Survival factors regulating ovarian apoptosis-dependence on follicle differentiation[ J ]. Reproduction, 2002, 123: 23—30.

[ 11 ] 张晓华,朱增娟,袁水桥,等.卵丘细胞在卵母细胞体外成熟培养过程中的作用[ J ].黄牛杂志,2005,31(3):43—45.

[ 12 ] 孙兴参,岳奎忠,马所峰,等.猪卵丘扩展与卵母细胞核成熟关系的研究[ J ].中国农业科学,2002,35(1):85—88.