

胰岛素和半胱氨酸对猪孤雌胚早期体外发育的影响

任子利^{1,2,4}, 赵彦玲^{1,2,4}, 田加运^{1,2}, 许丹娜^{1,2}, 潘天彪³, 黄敏瑞³, 卢晟盛^{1,2}, 卢克焕^{1,2}

(1 广西亚热带生物资源保护利用重点实验室, 广西南宁 530004; 2 广西大学 动物科技学院, 广西南宁 530004;
3 广西畜牧研究所, 广西南宁 530001; 4 西藏大学 农牧学院, 西藏林芝 860000)

摘要:探讨在 NCSU-23 中添加不同浓度的胰岛素和/或半胱氨酸对猪孤雌胚体外发育的影响. 结果表明, 在试验 1 中, 添加胰岛素的质量浓度为 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 猪孤雌胚的卵裂率及囊胚率显著高于对照组 ($P < 0.05$); 在试验 2 中, 添加半胱氨酸的浓度为 1.2 mmol/L 时, 猪孤雌胚囊胚发育率最高, 但添加的浓度大于 4.8 mmol/L 时, 猪孤雌胚的囊胚发育率显著降低 ($P < 0.05$); 在试验 3 中, 联合添加胰岛素和半胱氨酸时能显著提高猪孤雌胚的囊胚率 ($P < 0.05$). 因此, 在 NCSU-23 中添加一定浓度的胰岛素和/或半胱氨酸能提高猪孤雌胚发育到囊胚阶段的能力.

关键词:猪; 卵母细胞; 孤雌激活; 早期胚胎; 胰岛素; 半胱氨酸

中图分类号: S814.3

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2009)04-0082-04

Effects of Insulin and Cysteine on the *in vitro* Development of Porcine Parthenogenetic Embryos

REN Zi-li^{1,2,4}, ZHAO Yan-ling^{1,2,4}, TIAN Jia-yun^{1,2}, XU Dan-na^{1,2}, PAN Tian-biao³,
HUANG Min-rui³, LU Sheng-sheng^{1,2}, LU Ke-huan^{1,2}

(1 Guangxi Key Laboratory of Subtropical Bio-Resource Conservation and Utilization, Nanning 530004, China;

2 College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China;

3 Guangxi Institute of Animal Husbandry, Nanning 530001, China;

4 College of Agricultural and Animal Husbandry, Tibet University, Linzhi 860000, China)

Abstract: This study was to evaluate the effects of insulin and cysteine on the *in vitro* development of porcine parthenogenetic embryos. After parthenogenetic activation, embryos were transferred to culture medium (NCSU-23) supplemented with different concentrations of insulin and/or cysteine. In Experiment 1, when the concentration of insulin in the culture medium was 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the rates of cleavage and blastocyst were significantly higher than the control group ($P < 0.05$). In Experiment 2, when the supplementation concentration of cysteine was 1.2 mmol/L , the blastocyst rate of parthenogenetic embryos was the highest. In Experiment 3, a combination of supplementation with 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ insulin and 1.2 mmol/L cysteine in the culture medium could significantly increase the blastocyst development rate ($P < 0.05$). It is concluded that supplementation of a certain concentration of insulin and/or cysteine in the culture medium can promote the development of porcine parthenogenetic embryos *in vitro*.

Key words: porcine; oocyte; parthenogenetic activation; embryos; insulin; cysteine

早期胚胎体外培养体系至关重要, 会直接影响早期胚胎体外发育及最终的妊娠结果. 猪的早期胚胎体外培养发育率不高, 体外受精胚囊胚发育率 10% ~ 30%^[1], 猪体细胞核移植胚胎的卵裂率 30% ~ 90%, 猪的孤雌激活囊胚率 20% ~ 60%^[2-3], 胚胎移植后产仔存活率 0.3% ~ 0.9%^[4]. 因此如何

收稿日期: 2008-11-21

作者简介: 任子利 (1969—), 男, 讲师, 博士; 通讯作者: 卢晟盛 (1971—), 男, 研究员, 博士, E-mail: shengshenglu@sina.com; 卢克焕 (1945—), 男, 教授, 博士, E-mail: kehuanlu@gmail.com

基金项目: 国家自然科学基金 (30660127, 30860039); 广西科学研究与技术开发计划资助项目 (桂科能 0815011-6-3)

提高体外胚胎早期发育率,创建一种理想的早期胚胎体外培养体系,一直是该领域研究的重点和热点.关于培养基中添加胰岛素和半胱氨酸对猪孤雌胚体外发育影响的研究报道较少.有研究表明,在培养基中添加胰岛素对猪 ICSI 胚胎早期发育有促进作用^[5].本研究在 NCSU-23 中分别添加不同质量浓度的胰岛素或不同浓度半胱氨酸及二者联合添加,探讨其对猪孤雌胚体外发育的影响,目的是为克隆猪以及用体细胞克隆技术生产转基因猪提供技术支持,提高克隆猪的成功率.

1 材料与方 法

所用药品除特别说明外,均为 Sigma 公司产品.

1.1 猪卵母细胞的采集

从当地屠宰场收集母猪卵巢,置于 35 ℃ 左右添加抗菌素的生理盐水中 4 h 内运回实验室,除去卵巢上附着的输卵管等组织,用生理盐水冲洗干净.用带有 18 号针头的 10 mL 无菌注射器,抽取直径 3 ~ 6 mm 卵泡中的卵母细胞.将抽取液缓慢注入置于 37 ℃ 恒温锅的 15 mL 尖底离心管中,使卵母细胞自然沉降.沉降 15 min 左右后,可看到明显的界限,弃上清液,然后将沉淀用洗卵液稀释,在实体显微镜下迅速挑出胞质均匀且有 2 层以上完整致密卵丘细胞包裹的卵母细胞,用洗卵液洗涤 2 ~ 3 次,再用成熟培养液洗涤 3 次后进行体外成熟培养.

1.2 猪卵丘-卵母细胞复合体的体外成熟培养

成熟培养液为改良 TCM-199 培养基,添加了 3.05 mmol/L 葡萄糖、0.91 mmol/L 丙酮酸钠、1.2 mmol/L 半胱氨酸、0.5 μg/mL 促卵泡素和促黄体素、10 ng/mL 表皮生长因子、75 μg/mL 青霉素和 60 μg/mL 链霉素、体积分数为 10% 的猪卵泡液,用于猪卵母细胞的体外成熟培养.采用液滴式培养,液滴大小为 100 μL,每滴内培养 20 ~ 30 枚卵母细胞,培养条件为 39 ℃,含体积分数为 5% CO₂ 的空气,最大饱和湿度.培养 22 h 后换液,换成含同样成分和激素的新鲜成熟培养液继续培养 22 h.

1.3 体外成熟卵母细胞的孤雌激活

将体外成熟培养 44 h 的卵丘-卵母细胞复合体(COCs)转移到含体积分数为 0.1% 的透明质酸酶液滴中,用 100 μL 的移液枪反复吹打至完全脱去卵丘细胞,在体视显微镜下挑选胞质均匀的卵母细胞进行激活.将挑选好的卵母细胞用 5 μmol/L 离子霉素处理 5 min 后,再用 2.5 mmol/L 6-二甲氨基嘌呤处理 3 ~ 5 h.

1.4 孤雌胚的体外培养

将化学激活处理过的卵母细胞移入预先准备好的添加不同浓度的胰岛素(Sigma I-1882)和/或半胱

氨酸(Sigma C-7352)的 NCSU-23 培养液(添加质量分数为 0.4% 的 BSA)中,液滴式培养,液滴大小为 50 μL,每滴中培养 20 ~ 25 枚胚胎,培养条件为 39 ℃、含体积分数为 5% CO₂ 的空气、最大饱和湿度.体外培养第 48 h 观察卵裂率,第 7 d 观察囊胚率.

1.5 试验设计

试验 1:将化学激活处理过的卵母细胞随机分为 5 组,移入含有不同质量浓度胰岛素(0、2.5、5.0、7.5、10.0 μg/mL, Sigma I-1882)的胚胎培养液微滴中,体外培养到第 7 d 统计囊胚率.试验重复 10 次.

试验 2:猪孤雌胚在添加不同浓度(0、0.6、1.2、2.4、4.8、9.6 mmol/L, Sigma C-7352)半胱氨酸的胚胎培养液中培养到第 7 d 统计囊胚率.试验重复 10 次.

试验 3:猪孤雌胚放在胚胎培养液中培养到第 7 d 统计囊胚率:第 1 组为常规对照组(不添加胰岛素和半胱氨酸),第 2 组在 NCSU-23 中添加 2.5 μg/mL 胰岛素,第 3 组添加 1.2 mmol/L 半胱氨酸,第 4 组同时添加 2.5 μg/mL 胰岛素和 1.2 mmol/L 半胱氨酸.试验重复 12 次.

1.6 数据统计分析

将卵裂率和囊胚率先进行反正旋转换,再用 SAS 6.12 版的一般线性模型(GLM)下的 Duncan's 多重比较进行统计分析,检验各组之间差异的显著性.试验结果用平均值 ± 标准差表示.

2 结果与分析

2.1 胰岛素对猪孤雌胚体外发育的影响

如表 1 所示,在胚胎培养液中添加胰岛素组(2.5、5.0、7.5、10.0 μg/mL)对猪孤雌胚早期发育有促进作用,囊胚发育率以 2.5 μg/mL 添加组为最高,对照组为最低,二者差异显著($P < 0.05$),而各处理组间囊胚率差异不显著.

表 1 不同质量浓度胰岛素对猪孤雌胚早期发育的影响¹⁾
Tab. 1 Effect of different concentrations of insulin on the *in vitro* development of porcine parthenogenetic embryos

ρ(胰岛素)/ (μg · mL ⁻¹)	卵母 细胞数	卵裂率 ²⁾ /%	囊胚率 ³⁾ /%
0	157	81.7 ± 12.8(133)b	25.2 ± 11.4(43)b
2.5	169	89.4 ± 9.4(149)a	42.2 ± 15.9(75)a
5.0	165	84.5 ± 8.6(140)ab	34.2 ± 17.8(60)ab
7.5	161	85.2 ± 14.1(139)ab	39.6 ± 16.0(68)a
10.0	158	79.0 ± 14.5(128)b	38.0 ± 11.6(60)a

1) 同列数据后字母不同示差异显著($P < 0.05$, Duncan's 法); 2) 括号内为卵裂数; 3) 括号内为囊胚数

2.2 半胱氨酸对猪孤雌胚体外发育的影响

如表 2 所示,猪孤雌胚在添加不同浓度(0、0.6、

1.2、2.4、4.8、9.6 mmol/L) 半胱氨酸的胚胎培养液中培养的囊胚发育率在低浓度时呈现上升的趋势,以 1.2 mmol/L 添加组囊胚发育率最高,但当添加的半胱氨酸浓度大于 1.2 mmol/L 后,囊胚发育率开始逐渐下降,当半胱氨酸浓度大于 4.8 mmol/L 时,猪孤雌胚发育到囊胚阶段的能力显著降低($P < 0.05$).

表 2 不同浓度半胱氨酸对猪孤雌胚体外发育的影响¹⁾

Tab.2 Effect of different concentrations of cysteine on the *in vitro* development of porcine parthenogenetic embryos

c(半胱氨酸)/ (mmol·mL ⁻¹)	卵母 细胞数	卵裂率 ²⁾ /%	囊胚率 ³⁾ /%
0	123	84.3 ± 10.6(117)a	15.95 ± 5.3(22)a
0.6	122	76.8 ± 16.69(106)ab	20.8 ± 10.3(27)a
1.2	122	81.47 ± 11.53(111)ab	21.9 ± 7.8(29)a
2.4	122	76.0 ± 12.2(104)ab	19.2 ± 8.5(27)a
4.8	122	72.8 ± 8.3(99)b	6.5 ± 6.0(8)b
9.6	122	59.84 ± 11.98(82)c	0c

1) 同列数据后字母不同示差异显著($P < 0.05$, Duncan's 法); 2) 括号内为卵裂数; 3) 括号内为囊胚数

2.3 联合添加胰岛素和半胱氨酸对猪孤雌胚体外发育的影响

如表 3 所示,猪孤雌胚放在胚胎培养液中培养(第 1 组为常规对照组,第 2 组在 NCSU-23 中添加 2.5 μg/mL 胰岛素,第 3 组添加 1.2 mmol/L 半胱氨酸,第 4 组同时添加 2.5 μg/mL 胰岛素和 1.2 mmol/L 半胱氨酸),各组间卵裂率差异不显著,虽处理组间囊胚率差异不显著,但第 4 组囊胚率显著高于对照组($P < 0.05$).

表 3 胰岛素和半胱氨酸对猪孤雌激活胚胎早期发育的影响¹⁾

Tab.3 Effect of insulin and cysteine on the *in vitro* development of porcine parthenogenetic embryos

组别	卵母细胞数	卵裂率 ²⁾ /%	囊胚率 ³⁾ /%
1	157	76.7 ± 16.5(135)a	13.8 ± 10.3(23)b
2	189	75.6 ± 17.2(149)a	17.2 ± 14.8(35)ab
3	167	69.9 ± 17.3(117)a	18.5 ± 15.6(30)ab
4	177	76.1 ± 13.6(133)a	25.8 ± 13.2(43)a

1) 同列数据后字母不同示差异显著($P < 0.05$, Duncan's 法); 2) 括号内为卵裂数; 3) 括号内为囊胚数

3 讨论

3.1 胰岛素对猪孤雌胚早期发育的影响

胰岛素能促进细胞 DNA、RNA、蛋白质和脂类合成,调节质膜、酶和细胞核的功能.转铁蛋白有益于铁的转运而与细胞结合,减轻早期胚胎代谢产生的毒性金属离子的积累.胰岛素与其受体或胰岛素样生长因子 1 受体(IGF1-R)促进细胞生长^[5]. Rappolée 等^[6]与 Kapur 等^[7]在小鼠子宫腔液中检测到胰岛

素的存在,但 Doherty 等^[8]发现小鼠早期胚胎不能合成胰岛素.对患糖尿病大鼠或胰岛素分泌破坏小鼠模型的研究发现,其胚胎退化率增加^[9-10],提示胰岛素作为母源性因子,与相关受体结合后可影响胚胎发育.罗龙兴等^[5]探讨了不同质量浓度的胰岛素对猪 ICSI 胚胎早期发育的影响,发现质量浓度为 5 μg/mL 组,其囊胚率显著地高于对照组,而与 2.5 μg/mL 组的差异不显著.本试验猪孤雌胚在添加不同质量浓度(0、2.5、5.0、7.5、10.0 μg/mL)胰岛素的胚胎培养液中培养,总囊胚率以 2.5 μg/mL 添加组为最高,对照组为最低,二者差异显著($P < 0.05$),而各处理组间总囊胚率差异不显著.说明培养液中加入胰岛素明显可以提高猪孤雌胚胎囊胚的形成.这与 Lewis 等^[11]和 Lee 等^[12]相一致,Lewis 等^[11]研究胰岛素对猪的第 5 d 或第 6 d 体内受精胚在体外培养的影响时,发现在培养液中添加胰岛素能明显提高扩张囊胚率.本试验中也发现添加胰岛素后扩张囊胚明显增多,只是添加胰岛素质量浓度与他们不一致,这可能与胚胎类型及培养条件不同有关.

3.2 半胱氨酸对猪孤雌胚早期发育的影响

在体外成熟和胚胎培养过程中,谷胱甘肽(GSH)合成对改善卵母细胞成熟和胚胎的发育是一个关键事件.在牛和绵羊的卵母细胞体外成熟中,添加半胱氨酸到成熟液,GSH 含量增加,能提高胚胎囊胚率^[13-14].当成熟液或培养液中添加半胱氨酸或 β-巯基乙醇,GSH 含量增加^[13].在培养液中添加半胱氨酸,半胱氨酸的升高是维持细胞内 GSH 水平的一个关键因素.GSH 是通过 γ-谷氨酰循环来合成的,培养液添加半胱氨酸正好为 γ-谷氨酰循环正常进行提供保证,GSH 的合成也降低了培养液过氧化物水平,对胚胎发育有改善作用^[13].成熟液中添加半胱氨酸,在绵羊^[13]、牛^[14]、水牛^[15]、猪^[16-20]均有报道,而在胚胎培养液中添加半胱氨酸,在绵羊^[13]、牛^[14]、水牛^[15]也有报道,本研究在添加不同浓度(0、0.6、1.2、2.4、4.8、9.6 mmol/L)半胱氨酸的胚胎培养液中培养猪孤雌胚,总囊胚率以 1.2 mmol/L 添加组为最高,但当添加浓度继续升高后,猪孤雌胚发育到囊胚阶段的能力却逐渐下降.Anand 等^[15]在水牛胚胎培养液添加不同浓度半胱氨酸(0、0.05、0.1、0.2 mmol/L),0.05、0.1 mmol/L 组与不添加组差异显著,而 0.2 mmol/L 组无作用.本研究在猪胚胎培养液中添加半胱氨酸浓度高于 4.8 mmol/L 也有此现象.可能由于猪和水牛培养液不同,所用半胱氨酸的最佳浓度差异也很大.但是,在猪和水牛的胚胎培养液中,添加最佳浓度的半胱氨酸都能维持 γ-谷氨酰循环正常进行,提高 GSH 的合成,防止过氧化物的毒

害作用,因而提高胚胎的发育能力。

3.3 联合添加胰岛素和半胱氨酸对猪孤雌胚发育的影响

在以上试验优化的基础上我们又探讨了胰岛素和半胱氨酸联合添加对猪孤雌胚体外发育的影响,发现分别添加2.5 μg/mL胰岛素和添加1.2 mmol/L半胱氨酸的处理组囊胚发育率都高于对照组,虽差异不显著,但联合添加组的囊胚发育率却明显高于对照组,差异显著($P < 0.05$)。这也说明胚胎的体外培养是一个及其复杂的微环境,需要各种条件的优化,更需要一个模拟体内的最优组合。

总而言之,胚胎体外培养体系至关重要,它直接影响胚胎体外发育及最终的妊娠结果。猪的卵母细胞体外胚胎生产系统不仅关系到基础研究而且涉及体细胞核移植等诸多领域^[21]。尽管在猪的体外胚胎生产系统有许多成功的例子,但效率不高且不稳定,因此,需要在不断探索中来提高和优化猪的体外胚胎生产系统,为做进一步的猪的核移植奠定基础。

参考文献:

- [1] NAGASHIMA H, FUJIMURA T, TAKAHAGI Y, et al. Development of efficient strategies for the production of genetically modified pigs[J]. *Theriogenology*, 2003, 59(1): 95-106.
- [2] LEE J W, TIAN X C, YANG Xiang-zhong. Optimization of parthenogenetic activation protocol in porcine[J]. *Mol Reprod Dev*, 2004, 68(1): 51-57.
- [3] ZHU J, TELFER E E, FLETCHER J, et al. Improvement of an electrical activation protocol for porcine oocytes[J]. *Biol Reprod*, 2002, 66(3): 635-641.
- [4] 张运海. 利用体细胞核移植技术生产猪克隆胚胎的研究[D]. 北京: 中国农业大学生物学院, 2005.
- [5] 罗龙兴, 卢晟盛, 许丹娜, 等. 精子不同处理和胰岛素不同浓度对猪卵母细胞胞质内单精子显微受精的影响[J]. *中国兽医学报*, 2009, 29(5): 669-672.
- [6] RAPPOLEE D A, WERB Z. The role of growth factors in early mammalian development[J]. *Adv Dev*, 1994, 4(1): 411.
- [7] KAPUR S, TAMADA H, DEY S K, et al. Expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and its receptor in the peri-implantation mouse uterus, and cell-specific regulation of IGF-I gene expression by estradiol and progesterone[J]. *Biol Reprod*, 1992, 46(2): 208-219.
- [8] DOHERTY A S, TEMELES G L, SCHULTZ R M. Temporal pattern of IGF-I expression during mouse preimplantation embryogenesis[J]. *Mol Reprod Dev*, 1994, 37(1): 21-26.
- [9] LEA R G, MCCracken J E, MCINTYRE S S, et al. Disturbed development of the preimplantation embryo in the insulin-2 dependent diabetic BB/E rat [J]. *Diabetes*, 1996, 45(11): 1463-1470.
- [10] REHA K P, MIHALIK J, VESELA J, et al. Effects of im-
- paired maternal insulin secretion on preimplantation embryo development in ICR mice [J]. *Physiol Res*, 1996, 45(6): 453-458.
- [11] LEWIS A M, KAYE P L, LISING R, et al. Stimulation of protein synthesis and expansion of pig blastocysts by insulin *in vitro* [J]. *Reprod Fertil Dev*, 1992, 4(1): 119-123.
- [12] LEE M S, KANG S K, LEE B C, et al. The beneficial effects of insulin and metformin on *in vitro* developmental potential of porcine oocytes and embryos [J]. *Biol Reprod*, 2005, 73(6): 1264-1268.
- [13] DE MATOS D G, GASPARRINI B, PASQUALINI S R, et al. Effect of glutathione synthesis stimulation during *in vitro* maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content [J]. *Theriogenology*, 2002, 15(57): 1443-1451.
- [14] BALASUBRAMANIAN S, RHO G J. Effect of cysteamine supplementation of *in vitro* matured bovine oocytes on chilling sensitivity and development of embryos [J]. *Anim Reprod Sci*, 2007, 98(3-4): 282-292.
- [15] ANAND T, KUMAR D, CHAUHAN M S, et al. Cysteamine supplementation of *in vitro* maturation medium, *in vitro* culture medium or both media promotes *in vitro* development of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos [J]. *Reprod Fertil Dev*, 2008, 20(2): 253-257.
- [16] SONG K, LEE E. Modification of maturation condition improves oocyte maturation and *in vitro* development of somatic cell nuclear transfer pig embryos [J]. *J Vet Sci*, 2007, 8(1): 81-87.
- [17] KOBAYASHI M, LEE E S, FUKUI Y. Cysteamine or beta-mercaptoethanol added to a defined maturation medium improves blastocyst formation of porcine oocytes after intracytoplasmic sperm injection [J]. *Theriogenology*, 2006, 65(6): 1191-1199.
- [18] BING Y Z, HIRAO Y, IGA K, et al. *In vitro* maturation and glutathione synthesis of porcine oocytes in the presence or absence of cysteamine under different oxygen tensions: role of cumulus cells [J]. *Reprod Fertil Dev*, 2002, 14(3-4): 125-131.
- [19] BING Y Z, NAGA T, RODRIGUEZ-MARTINEZ H. Effects of cysteamine, fsh and estradiol-17beta on *in vitro* maturation of porcine oocytes [J]. *Theriogenology*, 2001, 55(4): 867-876.
- [20] YAMAUCHI N, NAGAI T. Male pronuclear formation in denuded porcine oocytes after *in vitro* maturation in the presence of cysteamine [J]. *Biol Reprod*, 1999, 61(3): 828-833.
- [21] ZHANG Kun, WANG Shao-hua, MA Yu-fang, et al. Effects of leptin supplementation in *in vitro* maturation medium on meiotic maturation of oocytes and preimplantation development of parthenogenetic and cloned embryos in pigs [J]. *Anim Reprod Sci*, 2007, 101: 85-96.