

文章编号:1000-582X(2003)04-0108-04

HMG在家兔超数排卵中的应用*

叶联顺¹, 计垣², 吕静², 刘冬芝¹, 荣颖¹

(1. 重庆市生殖健康中心, 重庆 400020; 2. 重庆市计划生育研究所, 重庆 400020)

摘要:用国产的尿促性腺激素(HMG), 孕马血清促性腺激素(PMSG), 人绒毛膜促性腺激素(HCG), 对40只母兔进行超数排卵处理试验。结果显示, 国产的HMG对母兔有良好的超排作用。试验兔中有90%表现出超排效应, 平均每只母兔可回收30.2个胚胎, 最多的一只母兔回收103个胚胎, 对照组(PMSG)平均为7.6个胚胎, 差异十分显著($P < 0.01$), 同时显示季节对超数排卵的影响也很大, 春季优于秋季。

关键词:兔; 促性腺激素; 超数排卵

中图分类号:S814.1; S829.1.3

文献标识码:A

超数排卵是胚胎生物工程中一个重要环节, 完善的超数排卵技术构成了胚胎移植成功的先决条件。利用外源性激素对动物进行诱导超数排卵, 可以一次性获得比正常情况下排卵多数倍的成熟卵母细胞和处于不同卵裂发育阶段的胚胎, 故超数排卵是当前动物生殖研究中获取大量胚胎的最有效的手段。现有的超数排卵方法效果都不十分满意, 在超数排卵处理过程中激素剂量也是较烦杂的一个问题, 剂量过低, 不足以引起较多卵泡成熟; 剂量过高时又引起“过刺激综合症”而减少卵子回收率。目前用于家兔超数排卵的外源性激素组合主要是FSH + HCG和PMSG + HCG, 所获的结果不尽相同^[1-8]。普遍认为FSH + HCG的方案优于PMSG + HCG^[8]。本研究以新西兰大耳白兔为研究对象, 用国产的尿促性腺激素(HMG)和孕马血清促性腺激素(PMSG)加上人绒毛膜促性腺激素组合的方案, 用肌肉注射代替静脉注射的方法, 对母兔进行超数排卵处理, 并以获取的卵泡数和胚胎数为比较指标, 分析研究HMG在母兔超数排卵中的作用, 以得到稳定、简易、操作方便的超数排卵方法, 为开展研究哺乳动物的体外受精、胚胎移植操作等提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

新西南大耳白兔由第三军医大学实验动物中心提供。母兔40只, 公兔6只, 另有4只为有过生育史的

母兔作受体兔, 一共50只。母兔为6月至12月龄的处女兔(从未与公兔合笼饲养), 公兔为成年有生育力的12月龄以上, 其中2只作结扎后用于假孕兔。在实验前分组, 分笼饲养, 1个月后再开始用作实验。母兔分为2组, 1组20只, 用PMSG作超数排卵处理, 分别作取卵和取胚实验。2组20只用HMG作超数排卵处理后分别作取卵和取胚实验。2只结扎后公兔作假孕实验、引诱排卵用。每只公兔均在术前作精液检查, 证明其确有生育力、精子质量良好才用。

1.2 实验用培养液及试剂

美国HYCLONE公司的M199培养基, 胎牛血清、人血清白蛋白及所需的化试剂等, 均由第三军医大学分子生物学中心提供。

1.2.1 M199液的配制

M199培养基在使用前, 用双蒸水配制, NaHCO_3 调pH为7.2, 无菌滤器抽滤灭菌, 加20%灭活小牛血清。

1.2.2 杜氏磷酸盐缓冲液的配制

I液: NaCl 8.00 g; KCl 0.20 g; Na_2HPO_4 1.15 g; KH_2PO_4 0.20 g; 双蒸水 800 mL。

II液: 人血清白蛋白 3.00 g; 葡萄糖 1.00 g; 丙酮酸钠 0.036 g; 抗生素 0.2 g; CaCl_2 0.1 g; 双蒸水 100 mL。

* 收稿日期: 2002-11-13

基金项目: 重庆市科技计划项目(99-5575)

作者简介: 叶联顺(1951-), 女, 重庆人, 重庆市生殖健康中心副研究员, 主要从事生殖生理、生殖病理, 生殖健康方向研究。

III液: $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.1 g; 双蒸水 100 mL

分别制备 I、II、III 种液, 依次混合后定容至 1 000 mL, 用 $NaHCO_2$ 调整 pH 至 7.1~7.2, 无菌滤器抽滤灭菌, 4 ℃ 冰箱保存(3~4 个月), 临用前加灭活小牛血清, 胚胎培养加 20%, 冲卵冲胚液加 1%~5%。

1.3 超排处理

促性腺激素选择了 3 种, 尿促性腺激素(HMG, 广东丽珠集团生产); 孕马血清促性腺激素(PMSG, 宁波激素制品厂生产); 人绒毛膜促性腺激素(HCG, 山东蓬莱华泰制药有限公司生产)。

1.3.1 PMSG + HCG 法

每次实验选 I 组 2 只发情母兔(阴道口潮湿呈粉红色), 分别肌肉注射 PMSG75 单位, 每天 1 次连续 2 天, 第 3 天肌肉注射 HCG80 单位(3.5 kg 以上的 100 单位), 然后其中 1 只立即与未结扎的公兔合笼自然交配作取胚用, 另一只与结扎后的公兔合笼作取卵用。

1.3.2 HMG + HCG 法

每次实验选 II 组 2 只发情母兔分别肌肉注射 HMG20~30 单位(体重 3.5 kg 以上的用 30 单位), 每天 1 次, 连续 2 天, 第 3 天肌肉注射 HCG80~100 单位, 然后立即与公兔合笼交配。其中 1 只与未结扎公兔合笼用于取胚; 另一只与结扎后公兔合笼用于取卵。

1.4 卵的回收

I 组和 II 组与结扎公兔合笼的实验母兔分别在注射了 HCG 后 15 h 左右回收卵子。方法为急性处死, 立即剖腹取双侧卵巢、输卵管、子宫, 并连同阴道一块取出。用文镊固定提取后, 观察卵巢表面的卵泡发育情况, 然后用 50 mL 空针, 针头用人工受精时专用的钝性针头, 吸满 M199 液, 通过输卵管伞端, 轻轻加压推入液体, 慢慢冲洗输卵管、子宫, 经阴道将冲卵液回收至玻璃皿中, 静置片刻后在解剖显微镜及相差显微镜下记录回收卵数, 最后用吸卵管吸出放入 M199 培养基中, 加灭菌石蜡油, 置普通培养箱中培养观察。

1.5 胚胎的回收

I 组和 II 组与未结扎公兔合笼的实验母兔分别在注射了 HCG96 h 以后(不超过 106 h)剖腹取胚, 方法同卵的回收, 通过输卵管伞端和子宫角, 用杜氏磷酸盐缓冲液冲洗输卵管和子宫, 经阴道回收液体, 冲胚液静置片刻后就肉眼检胚。胚胎放杜氏液中, 普通培养箱里待用。

1.6 胚胎的植入

选择 2 只成年结扎公兔与曾生育过的母兔假孕后作受体兔。受体兔与试验兔同时注射 HCG80~100 单位后分别与结扎后公兔合笼, 刺激排卵作假孕受体兔。

将所获得的胚胎用标准胚胎移植管(比利时佳妮妇科医疗器材公司提供)吸取肉眼观察发育良好的 10 只, 经阴道分别植入假孕母兔的左右子宫内, 将受体兔固定在试验台上 4 h, 再放入笼中分笼饲养观察。余下的胚胎放入杜氏液中, 加灭菌石蜡油覆盖, 置普通培养箱中培养观察。

2 结果与分析

1) 不同激素的超排效果

用 PMSG 和 HMG 对母兔进行超排处理或取卵取胚的结果见表 1, 表 2。

表 1 用 PMSG 和 HMG 对母兔超排取卵结果比较(平均值)

激素名称	实验兔数/只	总回收卵数/个	平均/只
PMSG + hcG	10	88	8.8 ± 3.49
HMG + hcG	10	310	31.0 ± 14.09

表 2 用 PMSG 和 HMG 对母兔超排取胚结果比较(平均值)

激素名称	实验兔数/只	总回收卵数/个	平均/只
PMSG + hcG	10	76	7.6 ± 2.95
HMG + hcG	10	302	30.2 ± 11.74

2) 普通培养箱中培养的卵和胚存活时间均只有 2~3 h, 因此没有作进一步的观察。

3) 经阴道植入的胚胎共成功生产仔兔 10 只。由于实验兔数太少, 没有作资料统计, 但认为这种方法是可行的, 有待下一步专题研究。

结果表明 HMG 的超排效果和胚胎的回收率均明显高于 PMSG, 经统计学检验, 有显著性差异($P < 0.01$)。在观察中还发现在 5~6 月份排卵数和胚胎数均高于秋冬季节, 有几只母兔在 6 月份时用 HMG 超排, 合笼后 96~106 h 取胚, 最多的达到 100 余个胚胎。这可能与母兔个体间反应、季节、取胚时间无不相关。

3 结论与讨论

1) 肌肉注射与静脉注射效果相同, 且更易操作。

2) 冲卵液可用 M199 液, 冲胚液及培养液用杜氏液。

3) 可以试用经阴道植入胚胎, 但是应注意选择合适的导管。

4) 母兔的选择及季节也是重要的因素。

5) 取卵方案经比较, 用 HMG 肌肉注射 20~30 单位(每次, 每只), 3.5 kg 以上的 30 单位, 2 天, 第 3 天肌肉注射 HCG80~100 单位(每只), 3.5 kg 以上的 100 单位, 并与结扎公兔合笼, 合笼后 15 h 左右取卵时间较合适。

6) 取胚方案经比较,用 HMG 肌肉注射 20~30 单位(每只,每次),2 天,第 3 天肌肉注射 HCG80~100 单位(每只),并与未结扎公兔合笼,合笼后 72~96 h 取胚效果较好,不能超过 106 h。

关于家兔的超数排卵方法报道很多,有多种方案,一般常见的组合方案是 FSH + HCG 或 PMSG + HCG 结果也不尽相同所获,普遍认为 FSH + HCG 的组合方案优于 PMSG + HCG^[9-10]。通过预试,调研,认为进口 FSH 价格贵,静脉注射不易操作。而目前临床运用较多的国产注射用 HMG 有其优越性,且经查阅资料发现,用国产注射用 HMG 作为动物超数排卵用药物尚未见报道,因此,选用 HMG + HCG 和 PMSG + HCG 方案对 40 只母兔进行超数排卵处理,比较结果表明 HMG + HCG 的超数排卵方法取得较好的超排效果。HMG 为绝经妇女尿中提取精制的糖蛋白促性腺激素。含有卵泡刺激素(FSH)和黄体生成素(LH)2 种生物活性成分,具有良好的促进卵巢分泌甾体性腺激素的功能,与 HCG 合用能较好的诱导排卵。从结果中不难看出 PMSG 超排的母兔回收的卵泡和胚胎与正常情况下母兔自然排卵数 6~9^[12] 个接近,而 HMG 超排的母兔十分显著地高于自然发情时的排卵数和胚胎数。在实验中发现用 PMSG 超排的母兔卵巢普遍增大明显,且颜色呈紫红色,有不少血性卵泡形成^[11],排卵点常常不清楚。而 HMG 超排的母兔卵巢虽然也增大明显,但颜色要浅淡很多,特别是血性卵泡较少,能清晰的看出排卵点。有人认为 PMSG 能引起卵泡囊肿和血卵泡,降低胚胎收集率,是因为在家畜体内降解慢,滞后影响大,对性腺影响剧烈^[3-4]。PMSG 在作用于卵巢时除大量卵泡迅速生长外,也促进卵巢本身的发育。特别是大剂量(100 TU)时,卵巢体积可达 1 CM 而输卵管伞依旧是正常大小,因此造成排了的卵子未进入输卵管中而直接掉入腹腔^[13]。实验也观察到这种现象,在系膜,阔韧带,伞端边都找到排出的卵。另外剂量不当也可使卵管产生过刺激,影响卵泡的正常发育,使部分卵子残留在卵泡中未排,即使有排卵点存在,卵子也没有排出来^[14]。实验中也有 1 只母兔表现为血性腹水,卵巢增大明显,较多的出血性卵泡。

实验中发现,即使用同样的激素进行超排,由于母兔个体间的反应,季节不同等因素,表现出极大的差异。实验中回收的卵和胚数可以从 0~15~103 个这么大的差异,虽说家兔繁殖无季节性,属刺激排卵,一年四季都可以繁殖,但实验中仍发现,在晚春和早夏时间(4~6 月)母兔对超排的反应效果好于秋冬和盛夏季节,特别是盛夏,在没有空调的实验室中,不但反应

差,而且不愿接受公兔爬跨,这可能与长期在室内环境笼养有关。

过早的回收卵细胞时,常常可以发现卵巢上排卵点不少,就是收不到较多的卵,过晚回收,则是发现卵巢排卵后的空泡点,回收到的卵数量也不多,这可能是由于母兔在注射了 HCG 后才开始陆续排卵,一些刚排出的卵尚停留在伞部和系膜上。回收卵的时间在注射 HCG 15 h 左右较为合适,胚胎的回收在桑椹胚和早期囊胚期较易操作,肉眼检胚,吸取,然后经阴道移植入宫腔内。太小(2~4~8 细胞期)易丢失,不易操作,太大已在子宫壁上植入(着床)无法回收。所以,经过反复实验,认为在合笼后 72~96 h 最多不超过 106 h 较合适,这时冲洗出的胚胎约 2~6 μm 大小,晶莹透明,沉于培养皿底部,如一颗颗透明的珍珠,肉眼就能检胚,用吸胚管很易操作,移植入受体兔也较易存活。

伴随着家畜人工受精技术,超数排卵技术的发展,胚胎移植(ET)已成为家畜繁殖工作中提高生产性能的另一有效技术措施,尤其是与人工受精结合使用时,能最大限度的发挥优良种畜的繁殖潜力。因此,ET 作为一项生物技术在畜牧业生产和科研中迅速发展,广泛应用于优良品种的快速繁育,但家兔的 ET 技术仅开展过一些基础研究。原因是非手术移植问题尚未解决,一直尚未转向产业生产^[7]。在这方面进行了一些探索,用标准胚胎移植导管吸取肉眼观察发育良好的早期囊胚经阴道移植入受体母兔左右两侧子宫内,结果,共产仔兔 10 只,由于受试母兔数量尚不够多,则得到较少的资料。

最后,通过实验发现,在动物超数排卵取得较好的结果背景下,也存在着一些目前尚不能很好解决的问题。如手术采卵/胚,处死取卵/胚,都是很麻烦或者不经济的方法。因此,非手术的方法是值得研究和探讨的。

参考文献:

- [1] 谭世俭,李雪. 家兔超数排卵结果报道[J]. 广西农业大学学报,1994,(1):93-98.
- [2] 向天浩,李德远. 家兔超数排卵和胚胎体外培养试验[J]. 河南农业科学,1994,(5):39-40.
- [3] 杨文胜,倪和民. 母兔超数排卵方法的研究[J]. 实验动物科学与管理,1996,(4):8-11.
- [4] 王海霞,贺桂馨. 两种剂量的 PMSG 对兔超数排卵效果的影响[J]. 黑龙江动物繁殖,1997,(3):8-9.
- [5] 李子义,周琪. 家兔的超数排卵[J]. 东北农业大学学报,1997,(3):275-28.
- [6] 王杰,刘广文. 家兔超数排卵处理对受胎率影响的研究

- [J]. 甘肃畜牧兽医, 1998, (4): 12-13.
- [7] 程广龙, 赵辉玲. 皖系粗毛兔超数排卵及胚胎移植的研究[J]. 中国养兔杂志, 1999, (5): 16-19.
- [8] 胡小九. 家兔超数排卵研究进展[J]. 当代畜牧, 2001, (3): 43-44.
- [9] 朱润美, 庄海博. 几种生殖激素诱发家兔超数排卵试验[J]. 中国养兔杂志, 1985, (4): 37-38.
- [10] 范必勤, 熊慧卿. 家兔超数排卵的研究[J]. 中国养兔杂志, 1986, (1): 25-35.
- [11] 张贵学, 贺桂声. 超排兔卵巢卵泡腔充血的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 1995, (11): 122.
- [12] GREGORY P W. The potential and actual fecundity of some breeds of rabbits[J]. J EXP Zool, 1932, 62: 271-285.
- [13] 谭景和, 秦鹏春. 超数排卵及其存在的问题(综述)[J]. 黑龙江畜牧兽医, 1987, (5): 33-37.
- [14] 范必勤, 熊慧卿, 邵春荣. 家兔超数排卵的研究[J]. 中国养兔杂志, 1987, (1): 25-30.

HMG Superovulation in Rabbits

YE Lian-shun¹, JI Yuan², LU Jing², LIU Dong-zhi¹, RONG Ying¹

(1. Chongqing Reproductive Health Centre, Chongqing 400020, China;

2. Chongqing Family Planning Scientific Research Institute, Chongqing 400020, China)

Abstract: HMG (made in china), PMSG and hcG on superovulation of 40 female rabbits are studied. Results indicate that the HMG (made in china) has a very good superovulation effect on rabbit. Among the treated animals 90% responded to the treatment and the average of embryos per rabbits collected is 30.2, 103 embryos were collected. 7.6 embryos were collected per rabbit. The difference is great ($P < 0.01$). The superovulation response of rabbits is better in spring than in Autumn.

Key words: rabbit; gonadotrophin; superovulation

(责任编辑 陈移峰)

(上接第107页)

Theory Model of Viscoelasticity of Hepatocellular Carcinoma Cells by Micropipette Aspiration Method

SONG Guan-bin¹, ZHAO Yan-hua², LONG Mian³,
WU Ze-zhi¹, WANG Yuan-liang¹, WANG Bo-chu¹, CAI Shao-xi¹

(1. College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China;

2. Department of Biology, Chongqing No. 1 Middle School, Chongqing 400030, China;

3. Institute of Mechanics, Chinese Academy of Science, Beijing 100080, China)

Abstract: The mechanical properties of cells are relation to their structure and function. Viscoelasticity is a kind of essence properties of cells and an important researching contents in the field of cellular mechanics. Micropipette aspiration technology is an advanced artifice on the level of single cell to study the mechanics of cells. In order to investigate the theory and method in researching mechanical properties of hepatocellular carcinoma cells with micropipette aspiration, hepatocellular carcinoma cells was regarded as an even linear solid and the standard linear solid viscoelastic model was chosen to describe viscoelasticity of hepatocellular carcinoma cells, theory model of viscoelasticity of hepatocellular carcinoma cells by micropipette aspiration was established according to the related papers, it will provide methodology reference for studies in this fields.

Key words: micropipette aspiration; viscoelasticity; model

(责任编辑 李胜春)