

不同培养条件和卵母细胞来源对黄牛卵母细胞 第一极体排出的影响

李东伟^{1,2,3,4}, 章美玲^{1,3,4}, 张运海^{1,3,4}, 章孝荣^{1,3,4*}

- (1. 安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036; 2. 阜阳师范学院生命科学学院, 阜阳 236037;
3. 安徽地方畜禽遗传资源保护与生物育种省级实验室, 合肥 230036; 4. 安徽省羊繁育工程技术研究中心, 合肥 230036)

摘要: 研究了培养液组分浓度、培养方法和卵母细胞来源对黄牛卵母细胞第一极体 (PB1) 排出的影响。从屠宰场收集黄牛卵巢, 使用抽吸法获取卵丘卵母细胞复合物 (COCs) 进行体外培养。结果表明, 采用以下培养条件能够显著促进黄牛卵母细胞 PB1 排出: 在培养液中添加 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ FSH 和 LH、 $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ $17\text{-}\beta$ E₂、 $33.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 丙酮酸钠; 培养时间 24 h, 培养密度每 50 μL 培养液培养 10~20 枚 COCs; 卵巢储运温度 25~37 °C, 储运时间 <3 h, 卵泡直径 3~6 mm, 卵丘细胞包裹 2 层以上。选择最佳的培养液组分浓度、培养方法和卵母细胞来源可获得最大 PB1 排出量, 为下一步利用 PB1 进行保护物种、扩大优良母畜遗传资源的来源和植入前遗传学诊断等研究提供参考。

关键词: 黄牛; 卵母细胞; 第一极体 (PB1); 体外培养

中图分类号: S823.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2013)04-0523-06

Effects of different culture and oocyte conditions on the first polar body extrusion of cattle oocytes

LI Dong-wei^{1,2,3,4}, ZHANG Mei-ling^{1,3,4}, ZHANG Yun-hai^{1,3,4}, ZHANG Xiao-rong^{1,3,4}

- (1. School of Animal Sciences and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;
2. School of Life Sciences, Fuyang Teachers College, Fuyang 236037;
3. Anhui Provincial Laboratory for Local Livestock and Poultry Genetic Resource Conservation and Bio-Breeding, Hefei 230036;
4. Engineering Research Center of Reproduction and Breeding in Sheep of Anhui Province, Hefei 230036)

Abstract: For investigating PB1 extrusion of cattle's oocytes under different component concentrations of culture solution, culture methods *in vitro* and oocytes derivation, COCs suctioned from abattoir-derived ovarian follicles were cultured under different situations. Results showed that the culture conditions *in vitro* promoted PB1 extrusion of cattle's oocytes significantly ($P < 0.05$). The optimized components added in the culture medium were $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ FSH, $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ LH, $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ $17\text{-}\beta$ E₂ and $33.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ sodium pyruvate, and the optimized culture time *in vitro* was 24 h; culture density was 10-20 COCs per 50 μL of the culture solution; temperature of ovaries storage and transportation were at 25-37°C, and transportation time was less than 3 h; the ovarian follicle diameter was 3-6 mm; and the oocytes covered 2 layer cumulus cells would well matured. The maximum available PB1 provided research basis for protecting species, improving genetic resources of excellent females and preimplantation genetic diagnosis in the future.

Key words: cattle; oocyte; polar body 1 (PB1); *in vitro* culture

极体 (polar body, PB) 是卵母细胞发生中产生的自然状态下无任何生理功能的细胞, 随着卵母细胞或胚胎的发育而自然退化。研究表明, 极体含有与卵母细胞一样的染色体和线粒体、皮质颗粒及内

收稿日期: 2012-09-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(31272442)资助。

作者简介: 李东伟, 男, 博士研究生, 讲师。E-mail: dw_lee@163.com

* 通信作者: 章孝荣, 男, 博士, 教授, 博士生导师。E-mail: zxr@ahau.edu.cn

质网等细胞器^[1-3]。由于卵母细胞不可在体外培养增殖且数量极为有限,另外现行的卵裂球活检进行植入前遗传学诊断对胚胎存在潜在的安全隐患^[4],因此与卵母细胞具有同样遗传背景的极体为人们研究卵母细胞发育、遗传物质冷冻保存和植入前遗传学诊断等提供了一个新的途径。目前,极体的生殖功能已获证实。Wakayama等^[5]报道利用小鼠极体重组卵母细胞获得了后代,He等^[6]成功利用玻璃化冻存小鼠极体得到了具有正常繁殖能力的后代。在国内,范必勤和刘文华等^[7-9]探索了极体获取的时间、条件和活性鉴定方法等,并通过体外受精和显微操作等方法的研究明确了猪极体能够支持其胚胎发育^[10-11]。辅助生殖领域的研究表明,通过PB1活检可以推测卵母细胞染色体异常,PB1形态可作为选择移植胚胎的指标之一,且对胚胎发育无不良影响^[12-15]。随着细胞核移植、辅助生殖和低温冷冻保存等生物学技术的发展,极体在保护物种和生物多样性、扩大优良母畜遗传资源的来源和植入前遗传学诊断的应用上将发挥更大的特殊作用。探究PB1的采集时间和条件是研究和利用PB1的一个先决条件。本研究以黄牛卵母细胞为实验对象,探究培养液组分浓度、培养方法和卵母细胞来源对其PB1排出的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂

TCM199、透明质酸酶、石蜡油、Hepes和丙酮酸钠购自Sigma公司;FBS购自Gibco公司;FSH、LH和 $17-\beta E_2$ 购自宁波第二激素厂。

1.2 实验方法

1.2.1 卵母细胞获取 卵巢收集自合肥市黄牛定点屠宰场。母牛屠宰后,立即取出卵巢,置于适当温度的生理盐水里,4h内运送至实验室,即使用一次性注射器抽吸卵巢表面卵泡液,而后使用口吸管在体式显微镜下捡取卵丘卵母细胞复合体(cumulus oocyte complexes, COCs)进行实验。

1.2.2 体外培养与PB1检测 将捡取的COCs用TCM199漂洗3遍,然后移入成熟培养液里,上覆石蜡油,置于 $38.5^{\circ}C$ 、 $5\% CO_2$ 和饱和湿度的培养箱里培养。卵母细胞基础培养液为TCM199添加 10% FBS,FSH、LH、 E_2 和丙酮酸钠依照浓度从低到高均分为4组加入基础培养液进行培养,其他培养条件参照文献^[16]。再使用最佳浓度组分的培养液,设计不同的培养时间和培养密度,以及按照不同的卵母细胞包裹卵丘细胞的层数、卵泡大小、卵巢储

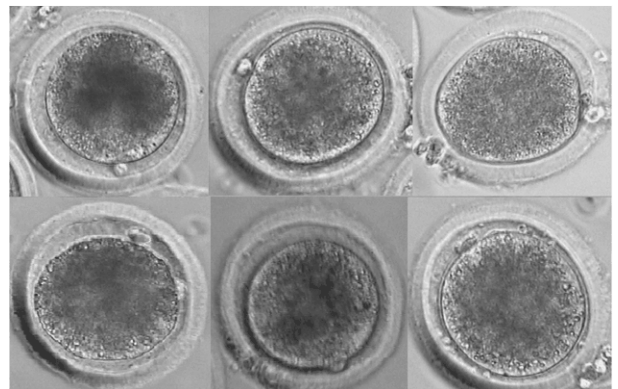
运温度和时间分别进行培养。成熟培养后在体式显微镜下置于 0.1% 透明质酸酶中,用手持口吸管反复吹打去掉卵丘细胞,拨动卵母细胞使PB1呈水平面进行统计及形态观察。

1.2.3 统计分析 使用SPSS11.0统计软件检验不同处理组之间的水平差异,数据以平均数 \pm 标准误($X\pm SEM$)表示, $P<0.05$ 为差异显著。每组试验重复4次以上($n\geq 4$)。

2 结果与分析

2.1 卵母细胞形态及分级

在体式显微镜下观察不同处理条件下卵母细胞中PB1形态变化,并对其进行活性分级。I级:PB1圆形或椭圆形,表面光滑;II级:PB1圆形或椭圆形,表面粗糙;III级:PB1碎裂,不规则;IV级:PB1巨大或超小^[17-18]。



A, B, C 分别为 PB1 I 级、II 级和 III 级; D, E, F 为 PB1 IV 级

图 1 PB1 形态活性分级

Figure 1 PB1 morphologic biopsy classification

2.2 培养液组分浓度对黄牛卵母细胞 PB1 排出影响

如表 1 所示, $0\sim 5 \mu g\cdot mL^{-1}$ FSH 和 LH、 $0.0\sim 0.5 \mu g\cdot mL^{-1}$ $17-\beta E_2$ 和 $0.0\sim 0.1 \mu mol\cdot mL^{-1}$ 丙酮酸钠体外培养的卵母细胞 PB1 的排出显著低于 $10 \mu g\cdot mL^{-1}$ FSH 和 LH、 $1.0 \mu g\cdot mL^{-1}$ $17-\beta E_2$ 和 $0.3 \mu mol\cdot mL^{-1}$ 丙酮酸钠试验组 ($80.18\%\pm 1.74\%$ 、 $80.00\%\pm 8.16\%$ 、 $76.67\%\pm 8.61\%$ 和 $77.50\%\pm 5.00\%$, $P<0.05$),且低浓度组卵丘细胞扩散不完全; $20 \mu g\cdot mL^{-1}$ FSH 和 LH、 $1.5 \mu g\cdot mL^{-1}$ $17-\beta E_2$ 和 $0.5 \mu mol\cdot mL^{-1}$ 丙酮酸钠试验组 PB1 排出率亦显著低于上述后者,但卵丘细胞扩散比较完全。因此认为, $10 \mu g\cdot mL^{-1}$ FSH 和 LH、 $1.0 \mu g\cdot mL^{-1}$ $17-\beta E_2$ 和 $0.3 \mu mol\cdot mL^{-1}$ 丙酮酸钠对黄牛卵母细胞 PB1 排出有显著的促进作用(实验数据显示 PB1 排出率最高可达 94.5%),后续实验培养液均为在基础培养液里添加

此 3 种浓度的组分。

2.3 培养方法对黄牛卵母细胞 PB1 排出的影响

如表 2 所示, 随着 COCs 体外培养时间的适当延长, 紧密包裹卵母细胞的卵丘细胞呈现辐射状扩散, PB1 排出率随之升高, 显著高于培养时间不足 20 h 的卵母细胞 PB1 排出率(80.00%±8.16% vs. 42.50%±9.57%, $P<0.05$), 但高活性的 PB1 排出率明显下降(本实验室未公开数据: 体外培养 16 h、20

h、24 h 和 28 h 后, 形态学判断为 I 和 II 级的第一极体排出率分别为 91.56% vs. 88.46% vs. 54.15% vs. 58.18%)。每 50 μL 培养微滴内放置 10 枚 COCs, 其 PB1 排出率最高, 且与放置 5 枚 COCs 的培养微滴相比, 具有显著性差异(76.67%±5.77% vs. 33.33%±11.55%, $P<0.05$)。结果表明, 10~20 枚 COCs 放入 50 μL 培养微滴内培养 24 h 左右, PB1 排出显著增高。

表 1 培养液主要组分浓度对黄牛卵母细胞 PB1 排出的影响

Table 1 Effects of concentration of medium components on the percent of PB1s extrusion of cattle's oocytes

组分 Ingredient	供试卵数/枚 Number of oocyte	组分浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Component concentration	PB1 排出率/% Extrusion rate of PB1
FSH	80	0	51.25±8.54 ^c
	390	5	63.65±4.06 ^b
	609	10	80.18±1.74 ^a
	435	20	69.00±9.30 ^b
LH	40	0	40.00±8.16 ^b
	40	5	52.50±9.57 ^b
	40	10	80.00±8.16 ^a
	40	20	25.00±12.91 ^c
E ₂	60	0.0	18.33±6.39 ^c
	60	0.5	41.67±6.39 ^b
	60	1.0	76.67±8.61 ^a
	60	1.5	56.67±8.61 ^b
丙酮酸钠 Sodium pyruvate	40	0.0	37.50±9.57 ^c
	40	11.0	42.50±9.57 ^c
	40	33.0	77.50±5.00 ^a
	40	55.0	65.00±5.77 ^b

表 2 培养方法对黄牛卵母细胞 PB1 排出的影响

Table 2 Effects of *in vitro* culture methods on the percent of PB1s extrusion of cattle's oocytes

培养方式 Cultivation method	供试卵数/枚 Number of tested oocytes	处理水平/h·枚 ⁻¹ Treatment level	PB1 排出率/% Extrusion rate of PB1
培养时间 Time	40	16	42.50±9.57 ^b
	40	20	75.00±5.77 ^a
	40	24	80.00±8.16 ^a
	40	28	77.50±9.57 ^a
培养密度 Density	30	5	33.33±11.55 ^b
	60	10	76.67±5.77 ^a
	90	15	71.11±3.85 ^a
	120	20	68.33±2.89 ^a

2.4 卵母细胞来源对黄牛卵母细胞 PB1 排出的影响

卵母细胞来源指的是卵巢储运、卵泡大小及 COCs 卵丘层数。如表 3 所示, 卵巢储运温度和时间对黄牛卵母细胞 PB1 排出有显著影响, 低于 25 $^{\circ}\text{C}$ 时(未冷冻) PB1 排出率较低(73.33%±5.77%, 63.33%±5.77% vs. 43.33%±5.77%, 16.67%±5.77%,

$P<0.05$), 运输时间超过 6 h 后 PB1 排出显著下降(73.33%±5.77% vs. 53.33%±5.77%, $P<0.05$)。直径 3~6mm 卵泡 COCs 卵丘包被较好, 达 2~4 层以上, 其 PB1 排出率为 73.08%±2.17%, 显著高于其他卵泡(53.12%±2.50%, 45.00%±14.72%, $P<0.05$)。

3 讨论

极体是卵母细胞在减数分裂产生的细胞，并不参与受精及胚胎发育，其功能长期被人们忽视。然而随着现代胚胎工程技术和辅助生殖技术的发展，包含有卵母细胞全部遗传信息的极体可能会被赋予全新的功能，如将优良种畜的卵母细胞极体移入普

通代孕母畜的去核卵母细胞中受精即可获得优良种畜后代，或者通过极体活检进行植入前遗传学诊断等，这些都将会产生较好的经济和社会效益。因此，探讨适合获取极体的卵母细胞培养体系就彰显其意义，相信随着生物技术发展的日新月异，对极体功能也将会有更深入的认识。

表 3 卵母细胞来源对黄牛卵母细胞 PB1 排出的影响
Table 3 Effects of oocytes derivation on the percent of PB1s extrusion of cattle's oocytes

卵源 Oocyte	供试卵数/枚 Number of tested oocytes	处理水平/ $^{\circ}\text{C}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mm}^{-1}\cdot\text{层}^{-1}$ Treatment level	PB1 排出率/% Extrusion rate of PB1
储运温度 Transportation temperature	50	4	16.67±5.77 ^c
	50	15	43.33±5.77 ^b
	50	25	63.33±5.77 ^a
	50	37	73.33±5.77 ^a
储运时间 Transportation time	90	3	73.33±5.77 ^a
	60	6	53.33±5.77 ^b
卵泡大小 Oocyte size	170	<3	53.12±2.50 ^b
	285	3~6	73.08±2.17 ^a
	65	>6	45.00±14.72 ^b
卵丘层数 Cumulus cell layer	60	5	78.33±6.39 ^a
	60	2~4	76.66±3.85 ^a
	60	<2	38.33±6.39 ^b
	60	0	0.00±0.00 ^c

卵母细胞体外培养成熟是获取极体的前提条件。实验用牲畜卵母细胞通常采集自屠宰场，其培养结果不仅取决于培养条件，还受到牲畜体况、卵巢采集和储运条件等不可控因素的影响。其中，培养液是实验研究卵母细胞体外培养的主要对象，多以 TCM199 中添加性激素、能量物质和血清等配制而成。在体内，卵泡的生长发育主要受促性腺激素和性腺类固醇激素调节，其中 FSH、LH 和 E2 相互协调，发挥关键作用^[19]。Real-time PCR 检测体外培养 COCs FSH receptor (r) 和 Cx43 mRNAs 表达在卵母细胞成熟 0~6 h 最强，而 LH(r) mRNA 表达则在卵母细胞成熟 6~24 h 内逐渐增强，且均高于裸卵相应 mRNA 表达(显示出卵丘细胞在卵母细胞成熟过程中的重要性)^[20]，然而高浓度 FSH (>2000 ng/mL) 会显著增加卵母细胞第一次减数分裂错误，导致其非整倍性升高^[21]。通过 Western blot 检测显示，雌激素受体(ER-alpha36)在小鼠卵母细胞成熟期内始终表达，将雌激素受体特异抗体注入小鼠 GV 期卵母细胞发现，多数 PB1 提前排出^[22]。FSH 和 LH 能够促进内源性雌激素的分泌，而外源性雌激素有降低内源性雌激素作用的趋势^[23]。同时外源激素也会

由于生产厂家及批次的不同而产生不同的效价。本试验结果表明， $10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ FSH、 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ LH 和 $1.0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ E₂ 对黄牛卵母细胞 Pb1 排出是有利的。

有报道，在培养液里添加少量丙酮酸钠可显著促进牛卵母细胞的体外成熟^[24]，丙酮酸盐可以作为卵母细胞发育成熟的主要能量底物^[25]，极体排出时丙酮酸盐摄入量和乳酸盐生成量较 GVBD 阶段显著减少，提示卵母细胞对能量底物的利用是一个动态过程。通过在猪卵母细胞体外培养液里添加丙酮酸钠，结果发现添加 $0.3\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 丙酮酸钠的培养效果最佳，添加 0.6 或 $0.9\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 丙酮酸钠的培养效果不理想^[26]，可能是由于高浓度丙酮酸钠超过了卵母细胞对其吸收利用的阈值并破坏了培养液自身的离子平衡。本试验结果表明，培养液里添加丙酮酸钠浓度在猪与牛上是相一致的。

不同哺乳动物极体排出时间有很大差异，黄牛卵母细胞体外培养中 PB1 排出高峰出现在 16 h，24 h 排出率可达 73.5%^[27]，然而利用含不同形态 PB1 的卵母细胞进行 ICSI 辅助生殖实验显示，不同 PB1 形态的卵母细胞其发育潜力显著不同，通过评估其形态可推断卵母细胞的异常^[28]。通过彗星试验发

现,山羊卵母细胞培养时间在 24 h 时 PB1 排出率最高,此后 PB1 逐渐退化,其 DNA 损伤程度明显增加,卵母细胞凋亡和老化的现象加重^[29]。本试验结果也表明,随着体外培养时间的延长,PB1 形态异常率增高。因此,黄牛卵母细胞 PB1 采集时间在体外培养 24 h 内较佳。

卵母细胞在卵泡微环境内生长,其自/旁分泌因子有利于卵母细胞发育成熟。在体外培养中,培养液为卵母细胞提供成熟的环境和所需的营养物质。早前有研究认为,培养液体积对卵母细胞的成熟有影响^[30-31],过多的卵母细胞聚集则易造成营养物的匮乏和代谢废物的积累^[15],可以推测卵母细胞生长有一定的密度限制。有试验表明,在 4 μ L 培养液含有 1 枚 COC 的比例条件下,宜使用 100~250 μ L 培养液进行卵母细胞体外培养,其 PB1 排出率可达 78.10%左右^[32]。本试验结果表明,在 50 μ L 培养液里放入 10~20 枚 COCs, PB1 排出率较高。

目前,实验用牲畜卵母细胞主要来源于屠宰场,通常需要采摘卵巢运输至实验室。因此,有必要研究卵巢质量和储运条件对卵母细胞体外成熟的影响。一般使用无菌生理盐水短时间内运送卵巢,卵巢离体运输时间过长,会因代谢障碍引起缺氧及有害物质积累等,导致卵泡内卵母细胞生物活性降低或退化甚至死亡。而卵巢的保存温度过高也会使卵母细胞出现热应激,如 hsp70 蛋白合成增加,影响卵母细胞遗传物质的稳定^[33]。目前普遍认为卵巢适宜的保存温度范围在 25~37 $^{\circ}$ C^[34]。有试验表明,牛与羊卵巢保存在 20~25 $^{\circ}$ C 可获得较高的 PB1 排出率^[35],牛卵巢在 37~39 $^{\circ}$ C 保存 8 h,卵母细胞 PB1 排出率将明显下降^[36]。本试验结果表明,离体卵巢在 25~37 $^{\circ}$ C 短时程(<3 h)运输对 PB1 排出无明显影响,而超过 6 h 后会大幅下降。

然而上述实验结果的取得都有一个前提,就是必须选择合适的卵母细胞进行体外培养。卵巢表面有大黄体或超大卵泡、颜色发紫及质地较硬,其卵母细胞较少包裹卵丘细胞,往往不适合进行体外培养,体外成熟较差;而卵巢质地柔软、色泽淡红、鲜亮饱满,卵泡突出表面且大小均等,其卵母细胞较为理想地包裹着卵丘细胞,在体外成熟的效果较好, PB1 排出率也较高^[37-38]。多数实验已表明,卵丘细胞对卵母细胞成熟排出 PB1 至关重要^[39-40]。卵丘细胞与卵母细胞间广泛存在的缝隙连接是进行小分子物质如 cAMP 等转移的必要条件^[41-42]。本试验结果表明,抽取自直径 3~6 mm 的卵泡包裹有 2 层以上卵丘细胞的 COCs 进行体外培养,其 PB1 排

出率较高。

综上所述,本实验成功探讨了利用黄牛卵母细胞体外培养获取 PB1 的多种影响因素,为深入开展哺乳动物极体发育功能的研究,通过极体冻存以保护物种遗传资源等提供了较为详实的参考资料。

参考文献:

- [1] Verlinsky Y, Rechitsky S, Cieslak J, et al. Preimplantation diagnosis of single gene disorders by two-step oocytic analysis using first and second polar body[J]. *Biochem Mol Med*, 1997, 62: 182-187.
- [2] Briggs D A, Pwer N, Lamb V, et al. Amplification of DNA sequence in polar bodies from human oocytes for diagnosing mitochondrial disease[J]. *Lancet*, 2000, 355: 1521-1522.
- [3] 孙青原. 哺乳动物受精过程卵激活细胞与分子机制[D]. 北京: 中国科学院动物研究所, 1996.
- [4] 吴亦波. 卵裂球活检出生小鼠老年罹患类神经退行性疾病的风险及其机制研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- [5] 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: 100-104.
- [6] He Z Y, Liu H C, Rosenwaks Z. Cryopreservation of nuclear material as a potential method of fertility preservation[J]. *Fertility and Sterility*, 2003, 2(79): 347-354.
- [7] 王公金, 范必勤, 刘文华, 等. 小鼠极体重组卵母细胞的体外受精与发育[J]. *农业生物技术学报*, 2008, 16(1): 77-81.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 王公金, 谭小东, 周小龙, 等. 猪第一极体核物质参与卵母细胞受精及其胚胎发育的研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2009, 40(8): 1139-1144.
- [11] 于建宁, 王公金, 周晓龙, 等. 猪第二极体核物质支持胚胎早期发育的研究[J]. *江苏农业学报*, 2012, 28(5): 1079-1082.
- [12] 郝大勇, 张展, 管一春, 等. 卵母细胞第一极体形态与卵胞浆内单精子显微注射受精率和胚胎质量的关系[J]. *郑州大学学报: 医学版*, 2012, 47(2): 232-234.
- [13] 何瑞冰, 汪存利, 姜宏, 等. 卵母细胞第一极体形态与女性年龄及 ICSI 结局的相关性研究[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2011, 19(4): 96-98.
- [14] 胡频, 徐孝凤, 曹云霞, 等. 人卵母细胞第一极体活检对胚胎发育影响的研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2009, 44(5): 583-585.
- [15] 陈雯, Schmutzler A, Weimer J, 等. 第一极体形态学与人类卵母细胞非整倍体相关关系的研究[J]. *现代妇产科进展*, 2003, 12(5): 321-323.
- [16] 王峰. 牛卵巢内卵母细胞采集、体外成熟与体外受精的研究[D]. 杨凌: 西北农业大学, 1994.
- [17] Ebner T, Yaman C, Moser M, et al. Prognostic value of first polar body morphology on fertilization rate and em-

- bryo quality in intracytoplasmic sperm injection[J]. Hum Reprod, 2000, 15(2): 427-430.
- [18] Ebner T, Moser M, Yaman C. Elective transfer of embryos selected on first polar body morphology is associated with increased rates of implantation and pregnancy [J]. Fertility and Sterility, 1999, 72(4): 599-603.
- [19] 张家骅. 家畜生殖内分泌学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2007.
- [20] Pandey A, Gupta S C, Gupta N. Effect of FSH and LH hormones on oocyte maturation of buffalo and gene expression analysis of their receptors and Cx43 in maturing oocytes [J]. Zygote, 2010, 18(3): 231-234.
- [21] Xu Y W, Peng Y T, Wang B, et al. High follicle-stimulating hormone increases aneuploidy in human oocytes matured in vitro [J]. Fertil Steril, 2011, 95(1): 99-104.
- [22] Xu B Z, Lin S L, Li M, et al. Changes in estrogen receptor-alpha variant (ER-alpha36) expression during mouse ovary development and oocyte meiotic maturation [J]. Histochemistry and Cell Biology, 2009, 131(3): 347-354.
- [23] 王洪进. 小鼠和山羊性成熟前卵巢卵泡发育与雌激素受体表达及其调控研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2012.
- [24] Geshi M, Takenouchi N, Yamauchi N, et al. Effects of sodium pyruvate in nonserum maturation medium on maturation, fertilization, and subsequent development of bovine oocytes with or without cumulus cells [J]. Biol Reprod, 2000, 63(6): 1730-1734.
- [25] Downs S M, Humpherson P G, Leese H J. Pyruvate utilization by mouse oocytes is influenced by meiotic status and the cumulus oophorus [J]. Molecular Reproduction Development, 2002, 62(1): 113-23.
- [26] 罗光彬, 李元玲, 贾俊龙, 等. 不同添加物质对猪卵母细胞体外成熟的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2012, 61: 60-62.
- [27] 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: 123-134.
- [28] Younis J S, Radin O, Izhaki I, et al. Does first polar body morphology predict oocyte performance during ICSI treatment? [J] Journal Assistant Reproduction Genet, 2009, 26(11/12): 561-567.
- [29] 赵晓鹏, 马斌斌, 孟永芳, 等. 彗星试验检测体外培养山羊卵母细胞的老化程度[J]. 农业生物技术学报, 2012, 20(12): 1433-1440.
- [30] Kato Y, Tsunoda Y. Effects of culture density of mouse zygotes on the development in vitro and in vivo [J]. Theriogenology, 1994, 41: 1315-1322.
- [31] Han Z B, Lan G C, Wu Y G, et al. Interactive effects of granulosa cell apoptosis, follicle size, cumulus-oocyte complex morphology, and cumulus expansion on the developmental competence of goat oocytes: a study using the well-in-drop culture system [J]. Reproduction, 2006, 132: 749-758.
- [32] 赵晓鹏, 屈晓君, 马保华, 等. 山羊卵母细胞体外成熟培养液体积筛选[J]. 畜牧与兽医, 2012, 44(6): 47-50.
- [33] Edwards J L, Hansen P J. Elevated temperature increase heat shock protein 70 syntheses in bovine two-embryos and compromises function of maturing oocytes [J]. Biology Reproduction, 1996, 55(2): 341-346.
- [34] 孙擎擎, 韩宝生, 李桂荣. 温度对体外受精影响的研究进展[J]. 中国妇幼保健, 2013, 28(6): 1035-1037.
- [35] 庞礴, 赵新全, 郭志林, 等. 保存温度对卵母细胞体外成熟率的影响及牦牛卵母细胞体外成熟培养方式初探[J]. 新疆农业科学, 2012, 49(6): 1158-1164.
- [36] Yang NS, Lu K H, Gordon I. In vitro fertilization (IVF) and culture (IVC) of bovine oocytes from stored ovaries[J]. Theriogenology, 1990, 33: 352.
- [37] 尹多, 柳海星, 李钟淑, 等. 季节对延边黄牛卵母细胞质量及体细胞核移植胚胎发育的影响[J]. 中国兽医学报, 2012, 32(12): 1896-1900.
- [38] 乔利敏, 张京和, 乔富强, 等. 卵巢质量和保存液对牛卵母细胞发育能力的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2012(7): 58-60.
- [39] 黄鑫, 郝翠芳. 人卵丘细胞与卵母细胞发育及成熟的关系[J]. 生殖与避孕, 2012, 32(8): 546-552.
- [40] 刘西梅, 华再东, 魏庆信, 等. 猪卵母细胞极体排出的规律[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(24): 5172-5190.
- [41] Baka S, Malamitsi-Puchner A. Novel follicular fluid factors influencing oocyte developmental potential in IVF: a review [J]. Reprod Biomed Online, 2006, 12(4): 500-506.
- [42] 任晶晶, 赵学明, 秦彤, 等. 小鼠卵丘细胞对牛卵母细胞体外成熟和孤雌发育的影响[J]. 农业生物技术学报, 2012, 20(4): 411-419.