

# 牛体外胚胎生产技术研究进展



■ 资料图片

□ 余冬冬 李伟 罗星 朱化彬

在畜牧业生产中,优质的种质资源匮乏和遗传进展速度缓慢一直制约着肉牛和奶牛的产业发展。得益于胚胎工程的发展,胚胎体外生产在牛的种质资源保护与良种扩繁中发挥着重要的作用,在发挥优质种牛的遗传潜力、提升繁殖效率、缩短世代间隔、加快遗传进展、保护种质资源等方面具有不可替代的优势。当下,胚胎工程技术正向分子和组学水平深入发展,并在此基础上产生了一系列新的技术,如胚胎冷冻、胚胎分割、孤雌激活、胚胎干细胞诱导分化和性别控制等。牛的体外胚胎生产体系在国内外已基本建立,但由于体外操作受诸多因素制约,导致其生产效率仍有待提升。目前通过基因表型分析对供体牛进行筛选,同时优化卵母细胞的体外培养/成熟体系,结合胚胎评估体系的完善,对进一步提高牛的体外胚胎生产效率具有重要作用,且对提升牛的繁殖效率也具有重要意义。

## 牛体外胚胎生产的现状

自1982年世界上第一头体外受精犊牛诞生以来,体外胚胎生产技术的发展十分迅速,已经成为动物胚胎工程的重要组成部分,并获得了广泛的应用推广,成为动物繁殖育种领域的一门实用技术。牛体外胚胎生产(IVEP)包括卵母细胞的体外成熟(IVM)、体外受精(IVF)以及早期胚胎体外发育培养(IVC)等一系列技术。

近年来,家畜繁殖效率由于生物技术的发展不断提高,通过IVEP生产的胚胎数量呈现指数级的增加。国际胚胎技术协会(IETS)最新数据显示,2023年全球(除中国外)共生产牛IVD(体内受精)胚胎327498枚,生产牛IVEP胚胎1876591枚,其中通过活体采卵(OPU)生产的IVEP胚胎为1862504枚,占2023年胚胎生产总量的84.5%,较2022年的79.3%显著增加。体外胚的生产数量已远超体内胚胎的生产数量,说明OPU-IVEP技术生产胚胎是未来胚胎技术发展的主流和趋势。

体外胚胎的生产主要包括活体采卵、体外成熟、体外受精及体外培养四个环节,只有合格的胚胎才能被选择用于后续的胚胎移植。由于体外胚胎生产的环境与体内胚胎生长发育的环境差异巨大,其体外发育过程与体内明显不同,因此只有严格把控体外胚胎生产的各环节,才能获得理想的胚胎发育效果。与IVD相比,IVEP来源的可用胚胎数量较少,囊胚发育率低,胚胎附着率和妊娠率较低,IVEP的效率提高对胚胎工程具有重大意义。

## 卵母细胞采集

### 1. 卵母细胞来源

最早用于生产IVEP的卵母细胞来源于屠宰后的卵巢上的可见卵泡(直径2—5mm),经此方法收集卵母细胞简便、成本低,但是屠宰母牛的遗传背景不清晰,且多为老弱病牛,卵母细胞质量较差,无法重复采卵。OPU是选择具有优秀生产性能和遗传背景的母牛作为供体,通过B超或内窥镜引导使用取卵针穿刺卵巢,收取卵巢上的有腔卵泡,包括经腹腔镜的采卵和经B超介导的采卵。经腹腔镜采卵(LOPU)的技术,可对供体重复取卵,但是对供体母牛的创伤较大,且手术部位容易发生粘连。自从Callesen等首次通过B超介导,穿刺牛卵巢成功收集卵母细胞以来,该技术成为收获牛卵母细胞的主要

途径,并在世界范围内得到了广泛应用。通过B超介导进行OPU操作,供体遗传背景清晰,对供体损伤小,可多次重复取卵,同时不受供体年龄和繁殖疾病等的限制,能充分发挥供体的遗传潜能,有效降低生产优质胚胎的成本。

幼畜体外胚胎移植(JIVET)是1965年由澳大利亚研究人员开发出的幼畜胚胎体外生产技术,其能进一步缩短世代间隔、加快遗传进展、充分利用母畜的卵母细胞库,也是IVEP研究领域的热点。由于幼畜卵巢上卵泡的发育既不受非繁殖季节和动物体重的影响,也不受性成熟后母牛卵巢上优势卵泡的影响,利用此阶段的卵母细胞生产体外胚胎是一项高效的IVEP新途径。根据犊牛的基因检测结果,选择育种价值高的犊牛作为供体,加大选择强度,能够极大地加快遗传进展的进程。

研究表明,通过外源激素处理犊牛获得的卵母细胞数量高于成年母牛,但犊牛来源的卵母细胞发育的囊胚率显著低于成年母牛。另外,Viana等的研究数据显示,无论使用何种激素处理方案,何种来源(屠宰/OPU/LOPU)的犊牛卵母细胞,来自低龄组(8月龄以内)的供体囊胚率显著低于高龄组(8—16月龄),来源于家牛(*Bos taurus*)属和瘤牛(*Bos indicus*)属的供体均符合此规律。JIVET技术的主要制约因素为胚胎生产的总体效率偏低,幼畜来源的卵母细胞的体外发育能力显著低于成年供体,对犊牛卵母细胞体外成熟机制的深入研究和体外培养体系的改进将是后续研究的重点。

目前OPU的卵母细胞主要取自卵巢上可见的有腔卵泡,而卵巢上大量腔前卵泡(preantral follicle)资源仍然无法利用,如何利用腔前卵泡以提高单次采集的卵母细胞数量,充分利用供体上的卵泡库,提高优质供体的后代数量,对体外胚胎生产具有重要的意义。

### 2. 卵泡大小与发育阶段影响采卵效果

研究显示,OPU收集到的卵丘—卵母细胞复合体(COCs)数量受吸取的母牛上大小卵泡(直径>4mm),其回收率比吸取小卵泡(直径≤4mm)的低30%,这可能是由于抽取过程中液体损失造成的。相反,经超排处理的母牛上吸取大卵泡获得的COCs数量更多,这可能是由于大卵泡更利于穿刺和抽取的操作。值得注意的是,抽取的针头选择、真空泵的压力和操作手法对回收效率有着重要的影响,对操作流程的优化可显著提高回收效果。

卵泡发育的阶段显著影响OPU的效果,当抽取处于生长阶段的卵泡,与处于优势卵泡闭锁阶段相比,能获得更多的大中(直径≥5mm)卵泡(+142%)和COCs(+121%)。根据Gimenes等的研究,在卵泡波出现后的1天、3天、5天进行OPU操作,所获得的COCs数量没有显著差异。通常认为,优势卵泡闭锁前收集的卵母细胞,其发育的潜能会受到明显的限制。以上结果提示,OPU可在卵泡波的生长和优化早期阶段进行。有趣的是,越接近优化尺寸卵泡,其卵母细胞的发育能力越好。优化卵泡的特征在于颗粒细胞上表达的LH(促黄体素)受体增加,使得其对FSH(促卵泡激素)依赖降低,从而使优势卵泡在低FSH水平下仍能存活并对排卵刺激信号(LH峰)作出响应。此外,随着FSH水平的下降,优势卵泡也发生了一系列变化,如细胞的分化、卵母细胞染色体浓缩等,这些变化对卵母细胞的

后续发育至关重要。因此,优化操作方案使卵母细胞具有优化或类优化化的卵泡,可提高卵母细胞的发育能力、改进IVEP的效率提供更好支持。

### 3. 评判指标

卵母细胞的质量高低是IVEP生产的关键,因此构建科学的卵母细胞评价体系就显得尤为重要。大量研究表明,个体卵巢内的有腔卵泡数量(AFC)是恒定的,如何最大限度地获取卵母细胞对提高IVEP的效率至关重要。

抗缪勒氏管激素(AMH)是由腔前卵泡和小的有腔卵泡的颗粒层细胞分泌的一种二聚糖蛋白。研究表明,AMH的水平和AFC(卵泡数量)呈明显的正相关关系,并且性成熟母牛中AMH的水平不受母牛发情状态与卵泡波阶段影响,可作为一个理想的评判AFC的生物指标。低AMH/AFC的母牛体内FSH和LH长期处于较高水平状态,且对外源FSH的响应更迟钝,经超排卵可获得更多的卵母细胞数量也更多。研究显示,无论是青年牛还是妊娠母牛,其体内AMH水平越高,可获得的卵母细胞以及胚胎数量也越多,提示可利用AMH/AFC的表型作为供体选择的重要依据。

### 4. 超数排卵

许多研究探讨了在OPU操作前使用FSH来诱导母牛产生更多的中等或大的卵泡,但是使用外源激素对母畜进行超排的意见尚不统一。对供体超排能获得的好处主要来源于两个方面:(1)获得更多的卵泡和COCs数量;(2)获得的卵母细胞发育能力更好。众多研究显示,使用FSH诱导母牛超排可获得更多比例的中等或大的卵泡,可充分利用大量即将闭锁的次级卵泡。尽管使用FSH并未发生新的卵泡募集,但是最终获得的卵泡数量明显提升,原因可能是FSH促进小的卵泡(直径<2mm)发育,从而获得更多的可见卵泡。相反地,也有研究显示,使用FSH后并未获得更好的卵泡数量,提示FSH可能会导致卵泡发育的不同步。

众多研究表明,使用FSH后可获得更多的COCs,卵丘细胞对卵母细胞的发育起到重要作用,卵丘细胞在IVM体系中的扩张能力是卵母细胞发育质量的重要标志。研究显示,经FSH处理后卵丘细胞的扩张能力得以提高,但其机理尚未完全清楚。最新的研究显示,在卵泡波的初始阶段使用FSH,卵母细胞的染色质量中等程度的压缩状态,表明其发育能力增强。相对应地,在卵泡波的任意阶段使用FSH则可导致卵母细胞发育能力受限,其原因可能是FSH促进卵泡生长,随后进入瓶颈或者闭锁阶段,进而使得卵母细胞发育能力下降。

由于动物垂体来源的FSH半衰期较短,故超排期间需要间隔12小时左右重复注射,多次注射FSH制约IVEP的生产效率。为解决这一问题,众多学者尝试将无活性的可降解多聚体结合到FSH上以延长其半衰期,从而达到一次注射即可实现超数排卵的目的。研究显示,减少FSH的注射次数后,牛只毛发中的皮质醇含量也显著降低,提示减少注射次数能减轻动物的应激水平。

## 卵母细胞体外成熟

### 1. 卵母细胞的成熟

哺乳动物卵母细胞成熟是其发育过程中重要的阶段,也是体外受精的前提和基础。只有成熟的卵母细胞才有受精能力,并支持胚胎由初始阶段发育到囊胚阶段。卵母细胞的成熟是一个复杂的过程,也是IVEP的关键环节,对卵母细胞的发育和胚胎的质量影响巨大。在这个过程中,生发泡破裂,第一极体排出,同时伴随着染色体凝集、透明带软化和卵丘细胞扩展等一系列变化。卵母细胞成熟至少包括细胞核和细胞质成熟两个部分,细胞核和细胞质的同步成熟是确保卵母细胞正常受精和胚胎正常发育的前提。

卵母细胞的细胞核成熟是指卵母细胞恢复减数分裂的进行,并达到第二次减数分裂(MII期)。从卵巢上获得的卵母细胞处于卵泡生长的不同阶段,主要是生发泡(GV)期和第一次减数分裂(MI期)前期。减数分裂的恢复是卵母细胞开始成熟的标志,此阶段的卵母细胞生发泡破裂,并排出第一

极体,由于第一极体容易被观察到,常作为判断卵母细胞核成熟的指标。

卵母细胞的细胞质成熟主要是指细胞器的成熟和重新分布,细胞质成熟是卵母细胞为其激活和原核形成过程及早期胚胎发育作准备的过程,对卵母细胞的受精以及早期胚胎发育具有至关重要的作用。卵母细胞的胞质成熟过程经历了一系列变化,包括细胞器的形态、功能以及分布发生变化和大量的mRNA(信使核糖核酸)发生转录、翻译与修饰,为卵母细胞的受精和早期胚胎发育积累了所需的能量、蛋白和mRNA等物质。颗粒细胞的部分变化和线粒体的形态变化及功能建立一般作为卵母细胞细胞质成熟的两个重要标志。

### 2. 双向培养体系

研究发现,传统的IVM体系内虽然卵母细胞能完成减数分裂,但其细胞质往往发育不完全,最终会影响卵母细胞的受精和胚胎的发育以及后续的附着,造成移植效率低下。为了更好地使卵母细胞的核成熟和细胞质成熟协调同步,近年来开发出了在传统的IVM前增加预处理的pre-IVM,以尽可能地模拟体内胚胎发育的环境,提高卵母细胞体外成熟的效率。

这种双向培养体系由pre-IVM和IVM组成,首先将收获的未成熟卵母细胞置于含减数分裂抑制剂的培养液中预处理一段时间,随后移入IVM中进行成熟培养。pre-IVM中的卵母细胞受减数分裂抑制剂的影响而停留在GV期,但是其细胞质的成熟却正常进行。当预处理结束转入IVM后,卵母细胞恢复减数分裂达到MII期,细胞核和细胞质都能继续发育成熟,从而实现更加同步的核质成熟。

### 3. 艾匹肽对卵母细胞发育的影响

艾匹肽(Epitalon)是一种抗衰老剂和端粒酶激活剂,最初于牛松果体提取物中发现,是一种人工合成的多肽,被称为上皮组织的维生素。研究发现,Epitalon可通过上调端粒酶(Telomerase)活性来延长染色体末端的端粒长度,从而延缓细胞的衰老进程。端粒通常位于真核细胞染色体的末端,由DNA重复序列和特异蛋白复合体结合而成,其长度随动物体的年龄增长而逐渐缩短。众多研究表明,端粒长度的缩短与细胞衰老和多种年龄相关疾病有关。最近的研究发现,健康的COCs其Telomerase位于细胞核内,而质量差的COCs其Telomerase位于细胞质中,且其水平显著下降,并且冻融后胚胎内的Telomerase活性显著下降。在IVM体系中添加Epitalon可显著提高卵母细胞的成熟率、卵裂率和囊胚率,并能提高冻融后胚胎囊胚的孵化率和定植能力(数据见表1)。

### 4. 细胞因子C型利钠肽对卵母细胞成熟的影响

生长因子对卵泡发育、卵母细胞成熟及胚胎早期发育具有重要的调节作用。大量研究表明,牛卵母细胞的体外培养中,各种细胞因子对卵母细胞的成熟有重要影响,如碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、白细胞抑制因子(LIF)、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)、转化生长因子-β1(TGF-β1)和C型利钠肽(CNP)等。

CNP是由血管内皮细胞合成的一种新型血管活动调节肽,是哺乳动物体内一种高保守的小分子多肽,主要分布于中枢神经系统,具有维持心血管系统稳定、调节细胞生长及激素水

平的作用。近年来研究发现,CNP在动物生殖过程中亦发挥着重要作用,可维持卵母细胞减数分裂的阻滞,从而更好地实现体外培养卵母细胞的核成熟和细胞质成熟的同步,已在卵母细胞体外成熟体系研究中被陆续使用。

在哺乳动物中,减数分裂的启动是由cAMP(环磷酸腺苷)的水平下降引起的,cAMP水平下降引起成熟促进因子(MPF)的活性增强,而MPF是卵母细胞内重要的减数分裂控制因子,可促进减数分裂过程中纺锤体的形成,所以卵母细胞内的高cAMP水平是维持减数分裂停滞的关键因素。由卵母细胞壁层颗粒细胞表达的CNP通过激活其受体NPR2(利钠肽受体2)诱导产生cGMP(环磷酸鸟苷),cGMP通过卵丘与卵母细胞之间的连接进入卵母细胞,可抑制卵母细胞内磷酸二酯酶3(PDE3)的活性,阻断cAMP向AMP(磷酸腺苷)转变的进程,从而维持卵母细胞内的cAMP水平,防止生发泡破裂(GVBD)即卵母细胞核成熟,从而抑制卵母细胞的减数分裂。

研究显示,卵母细胞经200nM的CNP预处理6小时后再转入IVM中培养28小时,可显著提高胚胎的囊胚率,并且线粒体的DNA数量显著提升。最新研究表明,CNP在pre-IVM通过结合其受体NPR2,激活环磷酸腺苷效应元件结合蛋白(CREB),促进CREB的磷酸化,提升卵母细胞内的p-CREB(磷酸化环磷酸腺苷效应元件结合蛋白)水平,从而促进线粒体的生物合成,为CNP影响卵母细胞的细胞质成熟提供了条件。

### 5. 抗氧化剂对卵母细胞成熟的影响

卵母细胞在体外成熟的代谢过程中会产生大量的活性氧(ROS),当ROS的产生速度超过其清除速度时会造成卵母细胞的氧化应激(OS),影响卵母细胞的质量,造成卵母细胞凋亡,降低后续胚胎发育和移植成功率。细胞内过量的ROS会降低三磷酸腺苷(ATP)含量,对线粒体造成损伤,并导致钙离子代谢紊乱、脂质及蛋白质发生过氧化反应,损伤细胞核DNA和细胞膜,影响卵母细胞发育,导致胚胎发育能力降低,造成受孕率下降,并对胚胎的发育产生负面影响。通过在IVM体系中添加抗氧化剂以清除过量的ROS,从而保护卵母细胞一直是近10年胚胎工程的热点研究领域。研究表明,通过使用褪黑素、白藜芦醇、辅酶Q10、维生素E及α-生育酚等抗氧化物质可以降低卵母细胞中的ROS含量,提高后续胚胎的发育效率。

对褪黑素的研究表明,褪黑素会影响卵巢功能,在人和猪的卵泡液中也已经报道了它的存在。研究发现,在卵母细胞的IVM培养液中加入1nmol/L的褪黑素能显著降低ROS的水平,并且使细胞内的线粒体分布更为均衡(83.67%VS 57.61%)。线粒体作为体内最主要产生ROS的场所,在发育阻滞的早期胚胎中观察到大量线粒体异常状况,包括线粒体的分布异常、结构异常及线粒体DNA量减少等现象。已有大量的研究证明,线粒体的活性、分布状况和拷贝数量对哺乳动物的卵母细胞细胞质成熟起着非常关键的影响。而Lima等的研究显示,在热应激条件下的IVM体系中,添加1mol/L和10mmol/L的褪黑素组都可获得质量更好的卵母细胞。Yang等在牛低质量卵母细胞(I0s)培养体系中加入1nmol/L的褪黑素,发现处于减数分裂MII期的卵母细胞比例显著高于对照组(71.4%VS 59.4%),提示褪黑素可促进

I0s的核成熟,这也为如何充分利用卵巢收集的卵母细胞提供了新的思路。各种类型抗氧化剂对卵母细胞的成熟率、卵裂率和囊胚率的影响数据见表2。

## 卵母细胞及胚胎的质量评估

选用高分评的优质卵母细胞和胚胎是提高胚胎移植成功率的先决条件,如何精准地识别胚胎卵裂期的特征,现已成为国内外胚胎领域的研究热点和重点,越来越多的新技术和解决方案正不断涌现。随着人工智能(AI)和深度学习(DL)的高速发展,计算机视觉技术在胚胎工程领域中的应用正不断深入,并取得了令人惊喜的成果。

目前卵母细胞和胚胎的质量评估仍依赖于传统的形态学评估,即针对处于原核期、卵裂期及囊胚期等不同发育时间点的胚胎形态学特征对胚胎进行评级,继而进行后续的胚胎移植操作。虽然已有一系列的形态学指标被用来评定卵母细胞和胚胎的质量以提高胚胎移植效率,但图像的质量、观察方法、操作人员的经验等均会对评估的准确性和一致性造成影响,且如何进一步对相同评级胚胎进行选择尚缺乏统一的标准。

在图像识别中,由于胚胎卵裂期的特征变化迅速,加上受采光视野和温度等气象条件影响,识别的准确性会受到干扰,而利用图像的时序性则可以改善该问题。胚胎发育是一个连续、动态的过程,应用延时成像技术(TLI),通过实时对胚胎发育过程中图像信息的记录,由系统将这些数据上传至云端,然后结合基于大量数据和算法的AI技术对胚胎图像进行分析和评估,则可大大提高胚胎培育的效率和精度。该技术可以在不干扰胚胎生长的情况下,持续观察和记录胚胎发育过程,可提高胚胎培育的成功率,整个环节无人作为因素干扰,胚胎发育过程稳定。

Cara Wells等开发出EM GENISYS系统,可通过使用智能手机录制30秒时长的胚胎培养视频,通过后台对胚胎形态动力学数据的分析,对胚胎等级进行评估。该系统不仅可应用于新鲜胚胎的评估,也可以对冷冻胚胎进行评估,通过智能手机即可操作,无需额外硬件支持,具有广泛的应用前景。

## 展望

牛体外胚胎生产技术因其对优质种质资源的充分利用,利于良种的快速扩繁和优质种质资源的保护,现已成为当下家畜繁育领域技术竞争的焦点。相较于发达国家,我国的牛体外胚胎生产仍处于起步阶段,尚未得到广泛应用。随着基因组学和代谢组学的深入发展,对优质供体牛的选择和完善体外成熟体系具有重要的意义。理论研究的深入和新技术的应用对提高牛体外胚胎生产效率具有重要的指导意义,对进一步优化与完善优质种畜繁育体系也将发挥越来越重要的作用。

(余冬冬 罗星单位:宁波第二激素厂;李伟单位:西北农林科技大学动物医学院;朱化彬单位:中国农业科学院北京畜牧兽医研究所)

(据《中国奶牛》)

## 专家谈养殖

组别	卵母细胞			解冻后的胚胎		
	成熟率(%)	卵裂率(%)	囊胚率(%)	24h孵化率(%)	48h孵化率(%)	总孵化率(%)
对照组	78.92±1.49	74.66±0.37	76.96±1.30	29.09±1.56	26.36±1.67	55.0±1.21
Epitalon组	88.75±0.42	80.98±1.72	78.69±0.9	62.04±2.20	16.0±1.28	78.40±2.56

▲表1 Epitalon对卵母细胞的发育和冻融后胚胎孵化的影响。

抗氧化剂	成熟率(%)		卵裂率(%)		囊胚率(%)	
	对照组	试验组	对照组	试验组	对照组	试验组
白藜芦醇	86.4±2.7	91.8±3.0	85.9±4.1	88.7±8.4	47.2±2.7	54.2±4.0
辅酶Q10	66.0±10.6	76.4±12.2	67.9±9.8	74.4±9.2	43.5±7.1	45.1±7.4
褪黑素	81.2±4.2	92.8±2.3	53.1±2.4	62.1±2.8	14.1±2.4	19.1±1.1
维生素A	-	-	66.7±2.7	70.1±3.9	21.9±1.9	24.2±2.7
维生素E	81.1±1.8	94.5±5.2	54.9±1.2	60.2±4.1	14.6±19.1	19.1±1.9
维生素C	80.2±2.8	85.0±2.3	56.5±4.2	65.3±3.1	12.8±1.6	20.2±1.1
类胡萝卜素	66.3±3.7	76.0±1.9	54.2±2.2	68.8±2.0	28.0±1.2	35.2±1.5
谷胱甘肽	-	-	61.8±5.4	71.1±5.2	15.7±5.7	23.8±5.9
硫酸锌	75.2±1.5	79.2±0.9	57.7±2.8	65.9±2.3	21.3±2.6	30.9±2.3

▲表2 不同类型抗氧化剂对卵母细胞的成熟率、卵裂率、囊胚率的影响。