

犬卵母细胞的体内成熟环境与体外成熟培养

邢 华

(扬州大学兽医学院 扬州 225009)

摘要: 犬(*Canis familiaris*) 是生物医学研究的最重要模型动物之一。但由于生殖生理的特殊性, 其卵母细胞的体外培养成熟率低, 辅助生殖研究进展缓慢, 严重制约了该动物在生物科学研究中的运用。在犬科动物体内, 排卵前卵母细胞处于高浓度孕酮的卵泡环境中, 在生发泡期排到输卵管内, 并在此恢复和完成减数分裂。因此, 犬卵母细胞体外成熟所需的条件不同于其他哺乳动物, 目前主要采用以添加相关因子的 M199 作为培养液, 但体外培养发育至 MII 期的比率仅为 15% ~ 20%。所以, 必须在了解犬卵母细胞体内成熟机制的基础上, 建立一套类似于体内生理环境的体外成熟培养体系。本文在阐述犬卵母细胞体内成熟生理过程的基础上, 对其体外成熟培养方法和影响因素的研究现状进行分析, 为相关研究提供参考。

关键词: 犬; 卵母细胞; 成熟; 体内; 体外

中图分类号: Q492, S814.8 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2009)06-160-06

In Vivo Maturation and *in Vitro* Culture of Canine Oocytes

XING Hua

(College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: The domestic dog (*Canis familiaris*) is one of the most valuable model animals for biomedical research. However, the canine reproductive physiology differs from that of other mammalian species studied to date. The efficiency of *in vitro* oocyte maturation is very low in this species, which limits the use of canine in the biological research. *In vivo*, the canine oocytes are exposed to a high concentration of progesterone in the follicular environment before ovulation, and they are released at the germinal vesicle stage. Oocytes then resume and complete meiosis within the oviduct. The conditions for *in vitro* maturation of dog oocyte may differ from those of other mammalian species. Currently, M199 medium containing several maturation factors is generally used for *in vitro* maturation culture of canine oocytes, but only 15% - 20% of ovarian oocytes reach the metaphase II stage. Therefore, an efficient *in vitro* culture system should be based on *in vivo* conditions in order to create a microenvironment similar to that in which oocyte development occurs physiologically. But, little is known about mechanisms regulating oocyte maturation in the dog. This review analyzes the known factors involved in canine oocyte maturation *in vivo* and *in vitro* in order to provide useful data for future development of modified canine oocyte maturation system.

Key words: Canine; Oocytes; Maturation; *In vivo*; *In vitro*

基金项目 国家重点基础研究发展规划 973 项目(No. 2003CB716603), 江苏省高校自然科学基金研究计划项目(No. 05KJB230161);

第一作者介绍 邢华, 男, 副教授; 研究方向: 实验动物学与动物生殖生理学; E-mail: hxing@yzu.edu.cn.

收稿日期: 2009-08-19, 修回日期: 2009-10-28

哺乳动物卵母细胞的成熟包括细胞核和细胞质成熟, 其间发生着保证受精和胚胎发育的形态及功能变化。大多数哺乳动物, 成熟卵泡以处于第二次减数分裂中期 (metaphase II stage, M II) 的次级卵母细胞排入输卵管, 而犬 (*Canis familiaris*) 成熟卵泡排出的卵母细胞处于生发泡期 (germinal vesicle, GV), 随后的成熟过程在输卵管内持续到排卵后的 2~3 d 内完成。母犬排卵虽然主要集中在发情开始的 1~3 d 内, 但在发情开始的 1~7 d 内随时都可发生排卵, 排卵的确切时间难以掌握^[1]。由于犬生殖生理的特殊性, 包括超数排卵、卵母细胞体外培养与体外受精等在内的辅助生殖技术 (assisted reproductive technique, ART) 研究进展缓慢。目前, 尽管国内外有一些犬科动物卵母细胞体外成熟培养和克隆犬的实验报道, 但成功率很低^[2~4], 其主要原因是对犬的生殖内分泌学及其卵母细胞成熟所需的条件与因子缺乏足够的了解。本文通过综述犬卵母细胞在体内成熟的生理生化环境、体外成熟培养方法与条件的研究进展, 分析其成熟的生理特点, 以帮助包括转基因犬构建在内的犬生殖生物学研究, 为挽救濒临灭绝的其他犬科动物的研究, 以及在生物医学研究领域充分利用该模型动物提供参考。

1 卵母细胞的体内成熟

在体内, 犬的卵巢卵泡和输卵管为卵母细胞成熟提供了各种所需因子。卵母细胞成熟过程中, 卵母细胞与其周围的颗粒细胞、输卵管上皮细胞之间, 卵母细胞与精子之间发生着结构和功能上的联系, 这些细胞及其相关因子调节着卵母细胞的生长与成熟。

1.1 卵泡的形态学变化及其与卵母细胞的联系 卵泡是卵母细胞生长、成熟的基本结构与功能单位。犬的原始卵泡 (直径 25 μm) 含有单层颗粒细胞和很小的卵母细胞; 腔前卵泡 [直径 (78 $\pm$ 15) μm] 的颗粒细胞层不完整, 卵母细胞呈灰白色; 高级腔前卵泡 [直径 (211.4 $\pm$ 1.5) μm] 中的生长卵母细胞, 包裹有多层紧密排列

的颗粒细胞, 胞浆已含有密集的脂质; 早期有腔卵泡 [直径 (360.1 $\pm$ 18.0) μm] 开始出现卵泡腔; 排卵前有腔卵泡, 平均直径达 3~10 mm。随着卵母细胞的生长, 其直径从大约 20 μm 增大到 120 μm , 并逐渐成熟^[5]。犬多卵卵泡的出现率高于其他动物, 1~2 岁龄的犬达 14%, 7~11 岁龄的犬也有 5%。这些多卵卵泡可能类似于单卵卵泡, 最终将卵母细胞排出或闭锁^[6]。

卵母细胞成熟过程中, 通过缝隙连接 (gap junctions, GJs) 与颗粒细胞间发生着营养物质、离子以及 cAMP 等调节小分子的交换。但是, 目前对于犬科动物 GJs 的研究仅是一些形态学的观察, 对蓝狐 (*Alopex lagopus*) 的研究发现许多放射冠细胞的胞浆突起伸入透明带, 通过 GJs 镶嵌入卵母细胞的卵黄膜; 排到输卵管内的卵母细胞, 其颗粒细胞很少扩散或不扩散, 甚至到受精后卵母细胞上还保留有放射冠细胞^[7]。

1.2 输卵管上皮的变化与受精时间 处于发情期母犬的输卵管内腔黏膜形成许多纵向皱褶, 其中分泌细胞占 40%~50%, 其分泌物对卵母细胞的成熟起着关键作用, 使卵母细胞在输卵管的存活时间达 8.5~9 d, 而其他动物只有 3~4 d^[8]。排出的卵母细胞, 在输卵管内保持有受精能力的时间至少达 4 d。由于母犬在排卵前 2~3 d 直至排卵后 1 周的一段时间均可接受交配, 在卵母细胞开始成熟前, 精子可能就存在于颗粒细胞-卵母细胞复合体 (cumulus oocytes complexes, COCs) 的周围。因此, 在交配 11 d 后, 输卵管内的卵母细胞可能还具有受精能力。但由于排卵、卵母细胞成熟、受精的严重不同步, 所以精子穿透卵母细胞的确切时间并不十分清楚^[9]。

1.3 生殖激素与成熟相关蛋白因子的变化 卵泡的生长主要是促性腺激素和类固醇激素共同作用的结果, 同时一些相关蛋白质因子调节着卵母细胞的成熟。

1.3.1 生殖激素 在排卵前后, 犬血浆生殖激素水平发生一系列规律性变化^[10]。卵泡刺激激素 (follicle-stimulating hormone, FSH) 在发情前

期的平均值为 100 ng/ml, 至排卵前黄体生成素 (luteinizing hormone, LH) 峰时则升高。雌二醇 (estradiol, E₂) 的含量在发情前期的末期和发情期的早期达到峰值 (50~110 pg/ml), 而发情期的浓度随孕酮 (progesterone, P) 的升高而下降。LH 在发情前期因 E₂ 的负反馈作用, 浓度很低, 亦无脉冲式释放; 在排卵前 1~2 d, 出现排卵前 LH 峰 (8~50 ng/ml)。P 在发情前期的早期浓度很低, 到排卵前 LH 峰时急剧升高。犬卵泡环境有别于其他哺乳动物, 卵泡在排卵前即发生黄体化, 排卵前卵泡液中孕酮的浓度达到 7~700 ng/ml, 使得卵母细胞处于高浓度孕酮环境中。虽然对这一现象的机制尚不祥, 但可能此为犬排出的卵为初级卵母细胞的原因之一。但当卵母细胞完全成熟时, 输卵管液中孕酮的浓度却较低。

1.3.2 蛋白因子 犬在发情周期的一定阶段, 输卵管黏膜的分泌细胞分泌一种高分子的非血清蛋白, 其通过与精子的相互作用有利于精子获能、运动、存活及对卵的穿透, 调控着受精和早期胚胎发育。LH 峰可能是影响核成熟启动和完成的主要因素, 其通过调节颗粒细胞与卵母细胞间的信号传导、影响细胞的离子转运和放大细胞的信号通路, 使“成熟促进因子” (maturation promoting factor, MPF) 和“有丝分裂活化蛋白激酶” (mitogen activated protein kinase, MAPK) 两种因子激活或失活, 从而启动或关闭核的成熟^[11]。

2 用于体外成熟培养卵母细胞的采集与形态学标准

2.1 COCs 的采集 采集动物 COCs 的方法, 通常有卵泡内吸出法、卵巢皮质分离法和卵巢皮质切割法等。由于犬卵巢体积小、处于乏情期或间情期的卵巢表面看不到卵泡等特点, 故在犬常采用卵巢皮质切割法采集 COCs, 该方法采集的 COCs 数量多, 卵母细胞减数分裂的恢复率高^[1]。在采集时, 首先以加有青霉素与链霉素的温热灭菌生理盐水清洗摘出的卵巢, 再以外科手术刀片或金属注射器针头反复切割卵

巢表面, 以 PBS 冲洗卵巢, 使其释放出 COCs^[12]。

许多因素影响 COCs 的获取率, 以消化法从杂种犬获取的 COCs 数量多于纯种犬 (351.8 ± 52.4 vs. 288.1 ± 43.6), 但用切割法获取卵母细胞的总数没有这种差别^[5]。供体犬的体重对 COCs 的获取率无明显影响^[13]。供体母犬的年龄影响着 COCs 的获取数, 发现 COCs 的平均获取率随供体年龄的增长每年下降 4.7 枚。对取自 6 岁以下和 7 岁以上母犬的卵母细胞体外培养比较, 发现年轻犬的卵母细胞在体外培养成熟的潜力更高^[14, 15]。供体母犬生殖生理周期对卵母细胞体外成熟率的影响存在不一致的研究结果, Rodrigues 等认为, 核的体外成熟不受母犬体内生殖阶段的影响^[16]。但更多的研究认为供体母犬发情周期阶段是影响卵母细胞在体外成熟率的关键因素, 发情期卵巢的内环境含有高浓度的雌激素、孕酮及一些未知因子, 有利于其后的体外成熟^[17]。发情周期对卵母细胞成熟影响的机制可能是颗粒细胞与卵母细胞之间 GJs 功能状态的改变, 乏情期母犬的 COCs, 颗粒细胞-卵母细胞间少有信号传导; 而发情前期末期的母犬, 大约有 89% 的 COCs 发生着这种信号传导。这种信号传导保证了其后减数分裂的恢复^[8]。而 Evecen 等的研究结果认为, 虽然发情时期对体外成熟率无明显影响, 但 COCs 运输、保存的温度影响了成熟率, 4℃ 运输有利于提高成熟率^[18]。这些研究结果说明, 供体体内合适的激素环境是保证卵母细胞体外成熟的重要因素。因此, 为了保证较高的卵母细胞体外培养成熟率, 宜选用 6 岁以下、处于发情期或发情前期的母犬作为 COCs 供体, 并以 4℃ 条件运输采集的 COCs。

2.2 用于 IVM 的卵母细胞形态学标准 为了进行成功的卵母细胞体外成熟 (maturation *in vitro*, IVM) 培养, 必须根据形态结构对采集的 COCs 进行选择。正常发育的犬卵母细胞胞浆内含有呈均一黑色的脂质卵黄物质。直径 (不含透明带) > 100 μm 的卵母细胞, 体外发育至 M I / M II 的成熟率为 20%; 而直径 < 100 μm 的

成熟率仅为 4% ~ 10%^[19]。只有带 2 层以上完整颗粒细胞的卵母细胞才能在体外培养条件下继续发育、并排出极体, 而仅有一层颗粒细胞的卵母细胞在培养 48 h 后退化^[20]。因此, 用于体外成熟的卵母细胞, 胞浆颜色应深暗而均一, 直径 > 100 μm, 有 2 层以上完整的颗粒细胞层。

3 卵母细胞体外成熟的培养体系

目前, 已经开展了犬、蓝狐等犬科动物卵母

细胞多种方式的体外培养实验。尽管培养的成熟率仍较低, 但积累了一些有价值的资料(表 1)。虽然卵母细胞与输卵管上皮细胞共培养、在游离输卵管中培养的策略, 可获得较高的成熟率, 但在实际工作中, 用于体外成熟培养的卵母细胞的供体大多为乏情期母犬, 难以获得足够数量发情期母犬的输卵管及其上皮细胞用作共培养。因此, 大多数研究者仍采用液滴法培养。

表 1 犬卵母细胞体外成熟培养的主要体系
Table 1 Main culture systems for canine oocyte maturation *in vitro*

体系 Systems	方法 Methods	影响因素 Main effects
卵泡培养 ^[21] Follicle culture	将采集的卵巢卵泡, 置于以 0.6% 琼脂覆盖培养液的平皿中培养	培养 48 h 时, 高级腔前卵泡和早期有腔卵泡, 分别有 11.5% 和 8.7% 的卵母细胞成熟至 MⅠ、MⅡ期。由于分离卵泡时, 引起的卵泡与卵巢内生理性成熟因子间交换的中断可能导致卵母细胞完成减数分裂能力的降低, 使得卵母细胞成熟率较低
液滴培养 ^[2, 22] Culture in drop	将机械分离法获得的 COCs, 置于以矿物液覆盖培养液滴的平皿中培养	此方式是最常用的培养体系。培养密度影响成熟率。由于颗粒细胞分泌许多因子到培养液中, 抑制 GJs 的解耦联作用, 阻断生发泡破裂 (germinal vesicle breakdown, GVBD), 密度过大抑制减数分裂恢复。比较研究发现, 乏情期的卵以 10 COCs/100 μl、发情后期的卵以 7 COCs/100 μl 较合适 ^[23]
与输卵管上皮细胞共培养 ^[24] Culture on cellular monolayer	COCs 与母犬输卵管上皮细胞, 置于培养液中共培养	此体系可明显提高卵母细胞成熟至 MⅡ的比例, 但对体外受精后的胚胎发育无明显影响。同时, 发现输卵管上皮细胞供体母犬的发情周期时相及上皮细胞的部位明显影响成熟率
在游离输卵管中培养 ^[25] Culture in the isolated oviduct	将卵母细胞在游离输卵管峡部-壶腹部中, 置于培养液中培养	此法有利于卵母细胞成活及核成熟, 成熟至 MⅠ和 MⅡ的比率达 12.5% ~ 31.9%。这可能是完整的输卵管除了提供输卵管细胞外, 还分泌与卵母细胞成熟及发育相关的能源物质、生长因子等其他因子

4 卵母细胞的体外成熟培养条件

卵母细胞体外成熟培养就是在体外模拟体内卵泡和输卵管的环境, 使其达到可以受精的成熟状态。主要条件包括基础培养液及其添加剂、培养时间与培养温度等。

4.1 基础培养液 用于卵母细胞培养的培养液分为单纯培养液和混合培养液, 单纯培养液是含有如丙酮酸盐、乳酸盐和葡萄糖等能源物质的缓冲盐溶液, 而混合培养液是添加有氨基

酸、维生素和其他物质的溶液。在犬卵母细胞 IVM 中, 使用的单纯培养液主要有改良 Krebs Ringer 重碳酸盐溶液和人工合成输卵管液 (synthetic oviduct fluid medium, SOF)^[24, 26]; 而混合培养液主要是 TCM 199^[14, 17, 19, 23- 25]。由于后者的相关成分为犬卵母细胞的体外成熟创造了最好的条件, 其使卵母细胞发育至 MⅡ期的比率明显提高^[7], 此溶液是各实验室目前最常用的培养液。

4.2 培养液添加剂 培养液添加剂主要包括

激素、蛋白质和能量物质等。对其他动物卵母细胞培养的研究表明,培养液中的 FSH 通过调节 COCs 内的 cAMP 水平而诱导减数分裂的恢复,FSH 同时还促使卵母细胞成熟所必需的颗粒细胞扩散。但犬卵母细胞核成熟的完成却与颗粒细胞的扩散程度呈负相关,在整个培养期使用促性腺激素,虽然促进了颗粒细胞的明显扩散,但对核成熟无明显影响^[7,27];但 Songsasen 等的研究显示,将犬的卵母细胞暴露在马绒毛膜促性腺激素 (equine chorionic gonadotropin, eCG) 中 60~240 min,使减数分裂恢复到 M I 期的比率提高^[30]。导致这些矛盾的原因可能是由于促性腺激素对犬颗粒细胞合成类固醇激素的作用时间不同所致。由于犬排卵前卵母细胞存在于高浓度孕酮的卵泡环境中,在体外以孕酮替代雌激素应该更有助于卵母细胞的成熟。但在成熟培养液中添加不同浓度 (0~8 000 ng/ml) 的孕酮,对核减数分裂的恢复未见有明显的促进作用^[10]。这些结果提示,欲确定在培养液中是否添加促性腺激素和类固醇激素,首先必须探明体内卵泡和输卵管环境中这些激素浓度的变化规律。

在犬卵母细胞体外成熟培养试验中,基础培养液中是否必须添加激素等因子、添加的浓度到底是多少,现在知之甚少。因此,必须加强激素等促进剂之间以及可能影响卵母细胞发育能力的抑制剂之间相互作用的研究,深入开展各种添加物的浓度及这些不同因子作用时间的研究。

4.3 培养时间与温度 犬卵母细胞体外成熟培养需要的时间变化很大,最长达 120 h,且体外成熟率的结果也存在着差别。虽然延长培养时间可以提高卵母细胞成熟率,但同时也提高了卵母细胞的退化率^[3,25]。Luvoni 等采用首先在游离输卵管内培养 24 h,再在液滴中培养 48~72 h 两步培养体系进行了卵母细胞培养的研究,使培养效果得到改善^[28];卵母细胞的退化率也明显低于单纯的液滴培养。一般认为,以 37~39℃、5% CO₂ 对犬卵母细胞进行培养,温度对成熟率无明显影响^[8]。而国内学者的研

究,发现培养温度可显著影响颗粒细胞的扩散程度,但其与核成熟的关系,未见进一步的研究报道^[3]。

5 结语与展望

根据已公布的犬全基因组序列分析,发现犬基因组与人的相似性达 95.7%,且有数百种遗传疾病与人类相似^[29]。因此,开展犬辅助生殖技术、转基因犬研究,对于人类相关疾病的研究具有重要意义。欲进行这些领域的研究,迫切需要设计一套适用于犬卵母细胞体外成熟的有效方法,为胚胎的体外操作提供充足的成熟卵母细胞。在设计培养方案时,必须以犬体内输卵管环境为依据,有利于卵母细胞完成核和胞质的成熟,使其获得发育的能力。由于缺乏犬卵母细胞在体内成熟调节机制的研究资料,许多理论问题还有待深入研究。到目前为止,关于犬卵母细胞的 IVM,如卵母细胞在卵泡内经历一个生理性的减数分裂停滞期后,排到输卵管的卵母细胞胞浆成熟到何阶段?排出的卵母细胞被放射冠细胞紧紧包裹,但这种体细胞在减数分裂暂停和减数分裂恢复中发挥着什么作用?在输卵管内,减数分裂恢复的时间较长,但输卵管因子和精子的相互作用对卵母细胞的成熟有多大程度的影响?体外研究的目的是要阐明这些问题,但结果常常受供体母犬生理状态的影响。这就提示在进行卵母细胞体外培养研究时,必须考虑上述这些因素,加强对排出的卵母细胞功能时相的判断研究。

参 考 文 献

- [1] Kim M K, Fibrianto Y H, Oh H J, *et al.* Effects of estradiol 17 β and progesterone supplementation on *in vitro* nuclear maturation of canine oocytes. *Theriogenology*, 2005, **63**: 1 342~1 353.
- [2] Vannucchi C I, Faustino M, Marques M G, *et al.* Effects of gonadotropin exposed medium with high concentrations of progesterone and estradiol 17 β on *in vitro* maturation of canine oocytes. *In Vitro Cell Dev Biol-Animal*, 2009, **45**: 328~333.
- [3] 贾丽玲, 刘国世, 张洪海等. 不同培养液及不同培养时间对犬卵母细胞体外成熟的影响. *中国畜牧杂志*, 2005, **41** (12): 25~27.

- [4] Lee B C, Kim M K, Jang G, *et al.* Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature*, 2005, **436**(4): 641.
- [5] Durrant B S, Pratt N C, Russ K D, *et al.* Isolation and characterization of canine advanced preantral and early antral follicles. *Theriogenology*, 1998, **49**: 917~ 932.
- [6] Telfer E, Gosden R G. A quantitative cytological study of polyovular follicles in mammalian ovaries with particular reference to the domestic bitch (*Canis familiaris*). *J Reprod Fertil*, 1987, **81**: 137~ 147.
- [7] Sisen V, Kalous J, Nagyova E, *et al.* Effects of follicle stimulating hormone, bovine somatotrophin and okadaic acid on cumulus expansion and nuclear maturation of blue fox (*Alopex lagopus*) oocytes *in vitro*. *Zygote*, 1998, **6**: 299~ 309.
- [8] Luvoni G C, Chigioni S, Allievi E, *et al.* Factors involved *in vivo* and *in vitro* maturation of canine oocytes. *Theriogenology*, 2005, **63**: 41~ 59.
- [9] Tsutsui T. Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. *J Reprod Fertil Suppl*, 1989, **39**: 269~ 275.
- [10] Willingham Rocky L A, Hinrichs K, Westhusin M E, *et al.* Effects of stage of oestrous cycle and progesterone supplementation during culture on maturation of canine oocytes *in vitro*. *Reproduction*, 2003, **126**: 501~ 508.
- [11] Motlik J, Pavlok A, Kubelka M, *et al.* Interplay between CDC2 kinase and MAP kinase pathway during maturation of mammalian oocytes. *Theriogenology*, 1998, **49**: 461~ 469.
- [12] Hatoya S, Sugiyama Y, Nishida H, *et al.* Canine oocyte maturation in culture: Significance of estrogen and EGF receptor gene expression in cumulus cells. *Theriogenology*, 2009, **71**: 560~ 567.
- [13] Strom H B, Larsson B, Rodrigues Martinez H, *et al.* Prediction of the oocyte recovery rate in the bitch. *J Vet Med A*, 2001, **48**: 587~ 592.
- [14] Hewitt D A, England G C W. The effect of oocyte size and bitch age upon oocyte nuclear maturation *in vitro*. *Theriogenology*, 1998, **49**: 957~ 966.
- [15] Lopes G, Sousa M, Luvoni G C, *et al.* Recovery rate, morphological quality and nuclear maturity of canine cumulus-oocyte complexes collected from anestrous or diestrous bitches of different ages. *Theriogenology*, 2007, **68**: 821~ 825.
- [16] Rodrigues B A, Rodrigues J L. Influence of reproductive status on *in vitro* oocyte maturation in dogs. *Theriogenology*, 2003, **60**: 59~ 66.
- [17] Martins L R, Ponchiroli C B, Beier S L, *et al.* Analysis of nuclear maturation *in vitro* matured oocytes from estrous and anestrous bitches. *Anim Reprod*, 2006, **3**: 49~ 54.
- [18] Evecen M, Cirit Ü, Demira K, *et al.* Effects of estrous cycle stage and transport temperature of ovaries on *in vitro* maturation of canine oocytes. *Anim Reprod Sci*, In Press, Corrected Proof, Available online 24 March, 2009.
- [19] Otoi T, Ooka A, Murakami M, *et al.* Size distribution and meiotic competence of oocytes obtained from bitch ovaries at various stages of oestrous cycle. *Reprod Fertil Dev*, 2001, **13**: 151~ 155.
- [20] Songsasen N, Yu I, Gomez M, *et al.* Effects of meiosis inhibiting agents and equine chorionic gonadotropin on nuclear maturation of canine oocytes. *Mol Reprod Dev*, 2003, **65**: 435~ 445.
- [21] Bolamba D, Border-Russ K D, Durrant B S. *In vitro* maturation of domestic dog oocytes cultured in advanced preantral and early antral follicles. *Theriogenology*, 1998, **49**: 933~ 942.
- [22] 王坤, 林涛, 赵明辉等. 孕马血清促性腺激素对狗卵母细胞体外核成熟的影响. *安徽农业科学*, 2008, **36** (35): 15 503~ 15 509.
- [23] Otoi T, Willingham L, Shin T, *et al.* Effects of oocyte culture density on meiotic competence of canine oocytes. *Reproduction*, 2001, **124**: 775~ 781.
- [24] Otoi T, Murakami M, Fujii M, *et al.* Development of canine oocytes matured and fertilised *in vitro*. *Vet Rec*, 2000, **146**: 52~ 53.
- [25] Luvoni G C, Chigioni S, Allievi E, *et al.* Meiosis resumption of canine oocytes cultured in the isolated oviduct. *Reprod Domest Anim*, 2003, **38**: 410~ 414.
- [26] Yamada S, Shimazu Y, Kawano Y, *et al.* *In vitro* maturation and fertilization of preovulatory dog oocyte. *J Reprod Fertil Suppl*, 1993, **47**: 227~ 229.
- [27] Hewitt D A, England G C W. Influence of gonadotrophin supplementation on the *in vitro* maturation of bitch oocytes. *Vet Rec*, 1999, **144**: 237~ 239.
- [28] Luvoni G C, Chigioni S, Allievi E, *et al.* Proceedings 3. Annual Congress European Veterinary Society for Small Animal Reproduction (EVSSAR). Dublin: EVSSAR, 2003, 123~ 124.
- [29] Lindblad-Toh K, Wade C M, Mikkelsen T S, *et al.* Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature*, 2005, **438**: 803~ 819.