

不同激素和注射方式对家猫超排效果的比较^{*}

文端成^{①②} 寇朝辉^① 陈大元^{①**}

(^①中国科学院动物研究所计划生育生殖生物学国家重点实验室 北京 100080;

^②广州医学院实验动物研究中心 广州 510182)

摘要: 比较了 PMSG/hCG 和 FSH/hCG 两种方案以及 PMSG 的不同剂量和注射方式对家猫的超排效果的影响。用 100 IU 的 PMSG 超排家猫所得到的排卵点数及平均每只猫获得的卵数显著低于 200 IU 处理组或 300 IU 处理组 ($P < 0.05$), 但 200 IU 处理组与 300 IU 处理组之间的超排效果也无显著差异 ($P > 0.05$); 用皮下注射 200 IU 的 PMSG 或用肌肉注射 200 IU 的 PMSG 对超排效果无差异 ($P > 0.05$); 用 200 IU PMSG/200 IU hCG 和 1.5 mg FSH/200 IU hCG 两种方案对家猫超排, 发现不论是每只猫的排卵点数、卵子获得数, 还是卵子的第一极体排放率都没有显著差异 ($P > 0.05$)。实验说明, PMSG 的注射方式不影响对家猫的超排效果, 用 200 IU 的 PMSG 超排家猫是较适合的剂量, FSH 和 PMSG 都可用于家猫的超排, 但 PMSG 使用更为方便。

关键词: 家猫; PMSG; FSH; 剂量; 注射方式

中图分类号: Q492 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2002)04-30-05

Effects of Different Hormone and Injection Method on Superovulation in Domestic Cat (*Felis catus*)

WEN Duan-Cheng^{①②} KOU Zhao-Hui^① CHEN Da-Yuan^①

(^① Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences Beijing 100080;

^② Laboratory Animal Research Center, Guangzhou Medical College Guangzhou 510182, China)

Abstract: Effects of PMSG dosage, injection method, as well as two different protocols (PMSG/hCG and FSH/hCG) on superovulation in domestic cat were compared in this experiment. The average number of ovulation sites (NOS) on ovaries was significantly higher in 200 IU group and 300 IU group compared to that of the 100 IU group when cats were intramuscularly injected PMSG to induce superovulation, but no difference was observed between 200 IU group and 300 IU group. There was no difference between injecting PMSG subcutaneously or intramuscularly in superovulation rate. The average NOS, oocyte recovery and percentage of first polar body in recovered oocytes were not

* 科技部攀登专项 (No: 95-专-08), 中国科学院创新工程重大项目 (No: KSCX1-05-01);

** 通讯作者;

第一作者介绍 文端成, 男, 38 岁, 博士; 研究方向: 生殖生物学。

收稿日期: 2002-01-30, 修回日期: 2002-05-22

significantly different between superovulation protocol of 200 IU PMSG/200 IU hCG and 1.5 mg FSH/200 IU hCG. The results suggested that PMSG injecting methods did not affect the superovulation rate; the dosage of 200 IU PMSG was optimal for cat superovulation; PMSG and FSH are equivalent in stimulating cat follicles; However, PMSG is more convenient to use.

Key words: Domestic cat; PMSG; FSH; Dosage; Injection method

家猫 (*Felis catus*) 是猫科动物中惟一一种未被列为珍稀或濒危物种的动物。由于家猫相对容易饲养,可大量繁殖,已成为一种十分重要的实验动物,有 36 种人类疾病可用家猫作为动物模型进行研究^[1]。由于大多数猫科动物都濒临灭绝,因而家猫在保护生物学研究上,是极具价值的模型动物和研究对象^[2]。现已证明,用于家猫的体外成熟-体外受精-胚胎移植 (IVM-IVF-ET) 技术也适合于其它猫科动物,如豹猫 (*Felis bengalensis*)、猎豹 (*Felis concolor*)、虎 (*Panthera tigris*)、印度沙漠猫 (*Felis silvestris ornata*) 等^[3-5],家猫还可作为多种野生小型猫科动物的胚胎受体,采用借腹怀胎的方法,用于繁殖其它濒危猫科物种^[6,7]。PMSG(孕马血清)、FSH(卵泡刺激激素)和 eCG(马绒毛膜促性腺激素)等激素常用来对家猫进行促排卵处理^[8-14]。在这些促排卵的研究中,激素的给药方式都是采用肌肉注射的形式。肌肉注射往往引起家猫产生较大的应激反应,使进一步的给药变得十分困难。虽然 PMSG、FSH 和 eCG 早已用来对家猫进行超排处理,但对这些激素的超排效果却是不同的实验室有不同的结果^[8-12,14]。本实验比较了 PMSG 和 FSH 两种激素、PMSG 的使用剂量和注射方式对家猫超排效果的影响,以期获得一种较适宜的家猫超排方案。

1 材料与方 法

1.1 动物饲养 健康性成熟的雌性家猫 50 只,体重 1.0~2.5 kg, 每只单独饲养在不锈钢笼内,饲料和水投放在笼内的食盒,自由采食,室内温度保持在 20~26℃,每天光照 12 h。家猫购进后,至少饲养 20 d,能正常进食、健康的动物才用于实验。

1.2 动物分组和处理 50 只家猫被分为五

组,分别用 FSH 和 PMSG 进行处理,处于发情期的猫暂不用于超排。用 FSH 处理猫根据 Verstegen^[10]的方法,但在剂量上作了一些调整。具体是每只猫每次皮下注射 FSH 0.15 mg,连续 5 d 每天二次,间隔 12 h,在最后一针 FSH 注射 12 h 后,每只猫肌肉注射 hCG 200 IU。PMSG 处理猫参考 Kanda 和 Donoghue 所提供的方法^[11,12],在剂量和注射方式上根据实验方案作相应调整。具体处理方案分为四个组,第一组每只猫一次性肌肉注射 PMSG 100 IU;第二组每只猫一次性肌肉注射 PMSG 200 IU;第三组每只猫一次性肌肉注射 PMSG 300 IU;在另一组中,每只猫一次性皮下注射 PMSG 200 IU。在注射 PMSG 96 h 后,肌肉注射 hCG 200 IU,注射 hCG 84 h 后从输卵管中冲卵。

1.3 动物麻醉和冲卵 在注射 hCG 84 h 后,按体重大小每只猫注射速眠新(846 合剂,长春农牧大学兽医研究所研制)0.4~1.0 ml,麻醉后,将猫固定在手术台上,剪毛及表皮消毒后,在腹中线用手术刀拉开一个约 3 cm 的口子,找到子宫和卵巢,结扎子宫的腹侧动脉和静脉血管,在宫管结合部将输卵管和卵巢一同剪下,洗净血迹,用注射器抽取约 2 ml 的 M2 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) 培养液,将针头从宫管结合部插入,用镊子夹住针头,注入培养液。冲下的卵团用 300 IU/ml 的透明质酸酶 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) 分散,将已分散的卵子吸出,在 M2 培养液中清洗 3 遍,分别计数总卵数和具有第一极体的卵数,统计完毕,将卵转入 M199+20% FBS 的培养液中培养。将卵巢与输卵管完全分离,计数两侧卵巢的出血点,一个出血点定为一个排卵点。

1.4 数据的统计处理 数据用 *t*-检验比较各组均数差异显著性。

2 结果

2.1 PMSG 的剂量与超排效果的关系 在三个剂量组中,以每只猫一次性注射 200 IU 的 PMSG 的超排效果较好(表 1)。在 100 IU 组中,

排卵点数和平均每只猫获得的卵子数均显著低于 200 IU 组和 300 IU 组 ($P < 0.05$); 在 300 IU 组中,排卵点数与 200 IU 组无显著性差异 ($P > 0.05$),但是,在 300 IU 组中,大部份卵巢呈紫色,子宫和输卵管明显充血。

表 1 不同 PMSG 剂量对家猫的排卵效果

组别	实验猫数	排卵点数/猫	卵子数/猫	总卵数	排放第一极体的卵数(极体排放率)
100 IU	10	6.5 ± 2.1 ^a	4.5 ± 1.4 ^a	45	34(75.6%)
200 IU	10	14.3 ± 4.9 ^b	9.0 ± 2.9 ^b	90	72(80.0%)
300 IU	10	16.0 ± 5.3 ^b	8.5 ± 3.7 ^b	85	73(85.9%)

ab. 在同一列中无相同的字母,表示两组数据间存在显著差异 ($P < 0.05$)

2.2 PMSG 的注射方式对超排效果的影响 在前一组实验中,通过剂量比较,发现 200 IU 组的排卵点数和平均每只猫获得的卵子数均优于 100 IU 组,而与 300 IU 组无显著差异。因此,在比较注射方式对家猫超排效果的影响时,每只

猫注射 200 IU 的 PMSG。结果无论是肌肉注射还是皮下注射 PMSG,平均每只猫的排卵点数和获得的卵子数均不产生显著影响 ($P > 0.05$) (表 2)。

表 2 不同的注射方式对家猫超排效果的影响

组别	实验猫数	排卵点数/猫	卵子数/猫	总卵数	排放第一极体的卵数(第一极体排放率)
肌肉注射(im)	10	14.3 ± 4.9	9.0 ± 2.9	90	72(80.0%)
皮下注射(sc)	10	14.6 ± 7.7	8.9 ± 5.3	89	74(83.1%)

2.3 不同激素的超排方案对家猫超排效果的影响 用 PMSG/hCG 和 FSH/hCG 两种超排方案对家猫进行超排,在本实验中,两种方案对家猫超排的效果没有观察到有明显的差异。通过两

种不同方案超排的家猫,不论是排卵点数,平均每只猫获得的卵子数,还是卵子的第一极体排放率,都没有统计学上的差异 ($P > 0.05$) (表 3)。

表 3 不同激素的超排方案对家猫的排卵效果的影响

组别	猫数	排卵点数/猫	卵子数/猫	总卵数	排放第一极体的卵数(第一极体排放率)
PMSG	10	14.6 ± 7.7	8.9 ± 5.3	89	74(83.1%)
FSH	10	13.0 ± 8.1	7.7 ± 5.0	77	60(77.9%)

3 讨论

PMSG 和 FSH 是两种常用的动物促排卵激素。PMSG 较多用于啮齿类如大、小鼠,地鼠等的超排,FSH 则较多用于中型或大型动物的超排,如家兔、牛、羊等。由于 FSH 在血液中很容易被代谢掉,是一种短效激素,在超排时,需要连续多次注射,才能有效地刺激卵泡的发育。PMSG 的代谢周期较长,一次注射可维持较长

的作用时间。在注射药物时,家猫往往会产生较大的应激反应。在小鼠、大鼠、绵羊和猪中,过多的应激反应会造成动物胚胎数和妊娠率降低^[15-18],对家猫,麻醉等刺激可以抑制其排卵^[9]。在本实验中,PMSG 和 FSH 对家猫超排后的排卵点数和平均每只猫获得的卵子数在统计上没有显著差异,但 PMSG 方案在操作上较为简便,对猫的刺激较少,因此,PMSG 方案比 FSH 方案更适合于家猫超排。激素的注射方式

只影响激素的吸收速度,而不影响超排效果。Swanson 使用 eCG 通过静脉注射和肌肉注射方式给药,对猫进行超排,发现两种注射方式对卵泡的发育不产生显著影响,但通过静脉注射比通过肌肉注射的猫要早一天出现发情^[14]。本实验也表明,激素注射方式不影响超排效果。作者比较肌肉注射和皮下注射 PMSG 对家猫的超排效果,两种注射方式,不论是排卵点数,还是平均每只猫所获得的卵子数都没有显著差异 ($P > 0.05$)。

PMSG 的剂量大小对家猫超排的效果可以产生显著影响。一次性肌肉注射 100 IU 的 PMSG,平均每只猫所得到的排卵点数显著低于 200 IU 组和 300 IU 组,这说明,注射 100 IU 的 PMSG 还不能有效地刺激家猫的卵泡发育;而在 300 IU 组中,每只猫的平均排卵点数并没有比 200 IU 组显著提高,但卵巢和子宫却明显地充血,猫处于过度刺激状态。因此,对猫超排以每只猫注射 PMSG 200 IU 的剂量较为适宜。

猫和家兔一样,属于刺激性排卵动物,外源的促排卵激素如 LH 和 hCG 均能够刺激其排卵。在注射 hCG 后,家兔在 12 ~ 14 h 排卵,而家猫则要在注射 hCG 80 多个小时后才能排卵。在给家猫注射 hCG 84 h 后,作者从输卵管中冲卵,发现多数时候,卵团还粘附于卵巢的表面或输卵管伞口,尤其是当卵巢被过量刺激,卵巢表面往往存留许多粘液,这些粘液将卵团粘附其上,用冲卵的方法难于将其冲下。这也许是本实验中排卵点数与卵子获得数有差别的主要原因。

卵子的第一极体排放,是作为卵子成熟的一个标志。在本实验中,卵子的第一极体排放率与激素的类型、剂量和注射方式没有显著差异 ($P > 0.05$)。当将那些没有第一极体的卵子(约占 15% ~ 20%)放入 M199 + 20% FBS 培养液中培养一段时间,有一部分还能继续排出第一极体。这种现象提示,猫经过超排处理后,虽然排卵,但排出的并不都是成熟卵子,部分卵子需要在输卵管中继续成熟。因此,作者认为,将冲卵时间适当后延,如在注射 hCG 90 h 后,也许

能够提高卵子的回收率和成熟卵子的获得率。

参 考 文 献

- [1] Migaki G. Animal models of inherited metabolic diseases. In: Migaki G, Desnick R J, Patterson D F eds. *Compendium of Inherited Metabolic Diseases in Animals*. New York: Alan R Liss, Inc, 1982. 473 ~ 501.
- [2] Wildt D E. A comparative overview of mammalian fertilization. In: Dunbar B S, O'Rand M eds. *Fertilization in Cats*. New York: Plenum Publishing Corporation, 1991. 299 ~ 328.
- [3] Goodrowe K L, Miller A M, Wildt D E. *In vitro* fertilization of gonadotropin-stimulated leopard cat (*Felis bengalensis*) follicular oocytes. *J Exp Zool*, 1989, **252**:89 ~ 95.
- [4] Miller A M, Roelke M E, Goodrowe K et al. Oocyte recovery, maturation and fertilization *in vitro* in the puma (*Felis concolor*). *J Reprod Fert*, 1990, **88**:249 ~ 258.
- [5] Donoghue A M, Johnson L A, Seal et al. *In-vitro* fertilization and embryo development *in vitro* and *in vivo* in the tiger (*Panthera tigris*). *Biol Reprod*, 1990, **43**:733 ~ 747.
- [6] Pope C E, Gelwicks E J, Wachs K B et al. Successful interspecies transfer of embryos from the Indian desert cat (*Felis silvestris ornata*) to the domestic cat (*Felis catus*) following *in vitro* fertilization. *Biol Reprod*, 1989, **40**(Suppl. 1):61. (Abstr.)
- [7] Pope C E. Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. *Theriogenology*, 2000, **53**(1):163 ~ 174.
- [8] Swanson W F, Wolfe B A, Brown J L et al. Pharmacokinetics and ovarian-stimulatory effects of equine and human chorionic gonadotropins administered singly and in combination in the domestic cat. *Biol Reprod*, 1997, **57**(2):295 ~ 302.
- [9] Howard J G, Barone M A, Donoghue A M et al. The effect of pre-ovulatory anaesthesia on ovulation in laparoscopically inseminated domestic cats. *J Reprod Fertil*, 1992, **96**(1):175 ~ 186.
- [10] Verstegen J P, Onclin K, Silva L D et al. Superovulation and embryo culture *in vitro* following treatment with ultra-pure follicle-stimulating hormone in cats. *J Reprod Fertil*, 1993, **47**(Suppl.):209 ~ 218.
- [11] Kanda M, Oikawa H, Nakao H et al. Early embryonic development *in vitro* and embryo transfer in the cat. *J Vet Med Sci*, 1995, **57**(4):641 ~ 646.
- [12] Donoghue A M, Johnston L A, Goodrowe K L et al. Influence of day of oestrus on egg viability and comparative efficiency of *in vitro* fertilization in domestic cats in natural or gonadotrophin-induced oestrus. *J Reprod Fertil*, 1993, **98**(1):85 ~ 90.
- [13] Goodrowe K L, Howard J G, Wildt D E. Comparison of em-

- bryo recovery, embryo quality, estradiol-17 β and progesterone profiles in domestic cats at natural or induce oestrus. *J Reprod Fertil*, 1988, **82**:553 ~ 561.
- [14] Swanson W F, Horohov D W, Godke R A. Production of exogenous gonadotrophin neutralizing immunoglobulins in cats after repeated eCG-hCG treatment and relevance for assisted reproduction in felids. *J Reprod Fertil*, 1995, **105**(1):35 ~ 41.
- [15] Euker J S, Riegler G D. Effects of stress on pregnancy in the rat. *J Reprod Fertil*, 1973, **34**:343 ~ 346.
- [16] Doney J M, Smith W F, Gunn R G. Effects of post-mating environmental stress or administration of ACTH on early embryonic loss in sheep. *J Agricultural Sci*, 1976, **87**:133 ~ 136.
- [17] Kittinger J W, Gutierrez-Cernosek R M, Cernosek S F Jr *et al*. Effects of adrenocorticotrophin on pregnancy and prolactin in mice. *Endocrinology*, 1980, **107**:616 ~ 621.
- [18] Hemsworth P H, Barnett J L, Hansen C. The influence of handling by humans on the behavior, reproduction and corticosteroids of male and female pigs. *Applied Animal Behavior Sci*, 1986, **15**:303 ~ 314.