

不同剂量孕马血清促性腺激素超排处理对家兔卵巢组织形态和胚胎发育的影响

杨喜喜 铁雅楠 王志亮 伏晓玉 王欣荣*

甘肃农业大学动物科学技术学院 兰州 730070

摘要: 为了研究不同剂量的孕马血清促性腺激素 (PMSG) 对家兔 (*Oryctolagus cuniculus f. domesticus*) 超排后, 卵巢组织形态和 PMSG 对早期胚胎体外发育的影响。将 24 只家兔分为对照组、50 IU、70 IU 和 90 IU 组, 每组 6 只, 对照组不做处理, 后 3 组分别注射 50 IU、70 IU 和 90 IU PMSG 和定量 100 IU 人绒毛膜促性腺激素 (HCG) 对家兔进行超排处理。解剖后测定卵巢形态和组织参数。利用注射器抽取 5 ml 冲卵液, 分别从左右输卵管冲取胚胎至培养皿中, 转至细胞培养室对胚胎进行体外培养观察。结果显示, PMSG 处理组与对照组相比, 随着 PMSG 注射剂量的增大, 家兔卵巢重及宽度和厚度均极显著增大 ($P < 0.01$), 卵巢长度显著增长 ($P < 0.05$), 卵巢表面充血, 卵泡数增多; 另外, 随 PMSG 注射剂量的增大, 次级卵泡及其卵母细胞直径、三级卵泡直径均呈减小趋势 ($P < 0.01$), 三级卵泡中卵母细胞直径呈增大趋势, 与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$); 三级卵泡的直径和卵泡的优势化率, 70 IU 组显著高于对照组及 50 IU 和 90 IU 组 ($P < 0.05$)。90 IU 的 PMSG 会导致超排的不良影响显现, 而 70 IU 的 PMSG 可促进三级卵泡中卵母细胞的发育、各级卵泡的数目增多及优势化率增高, 但同时也减小了各级卵泡的直径。胚胎体外培养时, PMSG 实验组与对照组相比, 因 PMSG 注射剂量的增大, 胚胎畸形率极显著增高 ($P < 0.01$), 2-细胞率极显著下降 ($P < 0.01$), 4-细胞率显著下降 ($P < 0.05$)。

关键词: 卵巢; 卵泡; 胚胎; 生殖激素; 家兔

中图分类号: Q492 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2023) 04-597-10

Effects of Different Doses of Pregnant Mare Serum Gonadotropin on Ovary Morphology and Embryonic Development in Rabbits

YANG Xi-Xi TIE Ya-Nan WANG Zhi-Liang FU Xiao-Yu WANG Xin-Rong*

College of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

Abstract: [Objectives] In order to study the effects of different doses of pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) on ovarian morphology and early embryo development *in vitro* after superovulation in rabbits (*Oryctolagus cuniculus f. domesticus*). **[Methods]** Twenty-four rabbits were randomly divided into four

基金项目 甘肃农业大学特色学科开放基金项目 (No. GAU-XKJS-2018-037);

* 通讯作者, E-mail: wangxr@gsau.edu.cn;

第一作者介绍 杨喜喜, 男, 硕士研究生; 研究方向: 动物繁殖学; E-mail: 1623304085@qq.com。

收稿日期: 2022-03-15, 修回日期: 2022-06-11 DOI: 10.13859/j.cjz.202304012

groups, with 6 rabbits in each group. The control group was not treated. The latter three groups were injected with 50 IU, 70 IU and 90 IU PMSG, and 100 IU human chorionic gonadotropin (HCG) for superovulation. After dissection, the morphology and tissue parameters of ovaries were measured. Embryos were flushed from the left and right Fallopian tubes into Petri dishes by using 5 ml washing solution and then transferred to the cell culture room for *in vitro* culture and observation. The results were expressed as “Mean $\pm$ standard deviation, and the data were analyzed by one-way ANOVA with SPSS 25.0. $P < 0.01$ means the difference is extremely significant, $P < 0.05$ means the difference is significant, and $P \geq 0.05$ means the difference is not significant. **[Results]** The results showed that compared with the control group, the weight, width, and thickness of ovaries in the PMSG-treated group increased extremely significantly ($P < 0.01$), the length of ovaries increased significantly ($P < 0.05$), the surface of ovaries became congested, and the number of follicles increased with the increase of PMSG injection dose (Fig. 1, Table 1). In addition, with the increase of PMSG injection dose, the diameters of secondary follicles and their enclosed oocytes, and the diameter of tertiary follicles decreased ($P < 0.01$), while the diameter of oocytes in tertiary follicles increased, with a significant difference compared with the control group ($P < 0.05$, Fig. 3, Table 3). The diameter of tertiary follicles and the dominance rate of follicles in the 70 IU group were significantly higher than those in the control group, 50 IU group, and 90 IU group ($P < 0.05$, Table 4). When the embryos were cultured *in vitro*, compared with the control group, PMSG treated group had a significantly higher embryo deformity rate ($P < 0.01$), significantly lower 2-cell rate ($P < 0.01$), and significantly lower 4-cell rate ($P < 0.05$, Fig. 2, Table 2) due to the increase of PMSG injection dose. **[Conclusion]** 90 IU PMSG superovulation can cause adverse effects, while 70 IU PMSG can increase the numbers of follicles at all levels and the dominance rate, and promote the development of oocytes in tertiary follicles, but reduce the diameters of follicles at all levels.

Key words: Ovarian; Follicles; Embryos; Reproductive hormones; Rabbits

哺乳动物在发育早期, 卵巢中的卵母细胞被单层扁平前体颗粒细胞包围后形成原始卵泡, 出生后其原始卵泡总和高达上百万个 (Aguiar et al. 2020), 但随着动物生长发育只有不到 1% 的原始卵泡发育为成熟卵泡并释放卵子, 其余 99% 的原始卵泡将退化、凋亡, 这种现象被称为卵泡闭锁 (Torre-Simental et al. 2021)。超数排卵是指在繁殖周期内给正常发情的雌性动物注射外源性生殖激素, 提高其体内生殖激素的浓度, 在排卵前刺激雌性动物卵巢, 使闭锁卵泡突破卵泡闭锁机制, 从而获得更多成熟可用的卵子 (任俊光等 2021)。随着超数排卵技术的日臻成熟, 科技工作者对卵母细胞及早期胚胎的需求量越来越大, 对哺乳动物胚胎发育机理的研究也越来越深入 (杨小淦等 2006)。超数排卵是获得大量卵子或胚胎的有效

方法之一, 当前已有很多关于家兔 (*Oryctolagus cuniculus f. domesticus*) 超排处理的研究, 且具有较好而稳定的超排效果 (李子义等 1997)。但目前对于家兔超排过程中卵巢的形态学特别是组织学变化的研究不是很多, 也不够系统。家畜超排多采用激素组合, 如孕马血清促性腺激素 (pregnant mare serum gonadotropin, PMSG) 和人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, HCG) 进行超排 (李子义等 1997, 田风林等 2020)。二者皆为蛋白激素, 进入机体发挥作用后会被完全代谢, 属于高效安全的激素类型 (罗昊澍等 2021)。本研究使用不同浓度的 PMSG 与定量 HCG 组合对家兔进行超数排卵处理, 运用解剖学和组织学方法观察超排处理后卵巢的形态及组织变化, 并比较超排后胚胎的体外发育状况, 分析外源性促性腺激

素对家兔卵巢组织形态和胚胎发育的影响, 为家畜超排机理的深入研究积累相关基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物

在甘肃靖远某肉兔养殖场挑选若干品种纯正、体格健壮的 5 月龄性成熟雌兔, 在经过消毒清洁的饲养舍单笼饲养, 自然光照、自由饮水, 使用优质苜蓿颗粒饲料 (山东金红利饲料有限公司) 每天定时定量饲喂约 1 周后, 分为对照组、50 IU、70 IU 和 90 IU 组, 每组 6 只, 进行实验。

1.2 方法

1.2.1 超排实验 PMSG 和 HCG 均用 0.9% 的生理盐水溶解稀释, 然后按照所需的单位确定用量。对照组不做任何激素处理, 实验开始后 72 h 与雄兔合笼交配; 而 50 IU、70 IU 和 90 IU 组为实验组, 在实验开始第 1 天的 15:00 时分别注射 50 IU、70 IU 和 90 IU 的 PMSG (宁波第二激素厂, 兽药 GMP 证字 11004 号, 1 000 IU), 继续饲喂 72 h 后再分别注射 100 IU 的 HCG (宁波第二激素厂, 兽药 GMP 证字 11004 号, 1 000 IU), 注射 2 h 后与雄兔合笼交配。对照组与实验组动物均在合笼完成交配 24 h 后采用耳缘静脉注射空气法处死, 分离出卵巢和输卵管, 用已吸取 5 ml 冲卵液 (ICP 公司) 的注射器刺入子宫角与输卵管连接处, 并将止血钳固定在针头后方, 缓慢推动注射器, 使冲卵液从输卵管伞部滴入培养皿, 从而冲出胚胎。

1.2.2 卵巢形态观察 完整剥离家兔卵巢, 测量其重量以及长度、宽度和厚度, 并记录卵巢上的充血卵泡和排卵点数。然后将其固定在 4% 多聚甲醛中备用。

1.2.3 胚胎冲洗及培养 将步骤 1.2.1 获得的胚胎在提前 6 h 平衡的 M23 冲洗液 (GIBCO 公司) 中冲洗, 然后使用微滴培养法随机将胚胎放入提前 6 h 平衡的 TCM199 (GIBCO 公司) 和胎牛血清 (GIBCO 公司) 以 9:1 配好的培养液中, 用石蜡油分层后用倒置显微镜观察并

记录胚胎情况, 时间不宜过长, 以免影响胚胎后续发育。观察结束后将其放入 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱 (二氧化碳培养箱, 新加坡 ESCO 公司) 中继续培养, 每 8 h 观察一次, 记录胚胎发育情况, 并清除死亡胚胎。每 24~36 h 换液一次, 直至所有胚胎停止发育。在倒置显微镜下观察并计数, 0~24 h 统计 2-细胞胚胎数, 24~36 h 统计 4-细胞胚胎数, 36~48 h 统计 8-细胞胚胎数, 48 h 至胚胎死亡统计桑椹胚胚胎数。

1.2.4 胚胎鉴定 根据胚胎整体形态、卵裂情况和碎片化程度进行鉴定。其中, 正常胚胎卵裂球大小均匀整齐, 结构紧凑, 整体形态相对完整, 色调透明度适中, 没有或有少量游离液泡和细胞。卵裂球破碎及大小、密度不均, 结构松散, 色调发暗的为不可用胚胎。而形态结构不完整, 色调发暗, 模糊不清甚至溶解的为死亡胚胎 (曾滔等 2017, 张晓磊等 2021)。

1.2.5 组织切片的制备 取用 4% 多聚甲醛中固定 24 h 以上的卵巢组织, 修块, 经二甲苯、梯度乙醇脱水、浸蜡、包埋、切片、摊片、沾片、烤片、二甲苯脱蜡苏木精染色、盐酸分化、水洗、伊红染色、梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片等步骤制作成组织切片, 显微镜检, 图像采集, 观察卵巢内卵泡发育情况。

1.3 数据统计与分析

使用 SPSS 25.0 软件处理所得数据, 各组数据进行单因素方差分析及多重比较。 $P < 0.01$ 表明组间差异极显著, $P < 0.05$ 表明组间差异显著, $P \geq 0.05$ 表明组间差异不显著。

2 结果

2.1 不同剂量孕马血清促性腺激素处理后卵巢形态的变化

对照组家兔卵巢呈自然生长状态下的淡粉色、纺锤形, 大小正常, 质感较硬, 不易变形 (图 1a), 3 个实验组的卵巢均体积膨大, 表面凹凸不平, 充血卵泡增多 (图 1)。测定卵巢重、卵巢长度、宽度及厚度 (表 1), 卵巢重 50 IU、

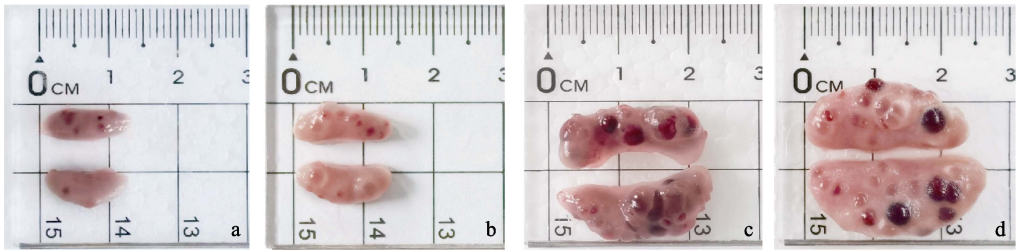


图 1 不同剂量孕马血清促性腺激素处理后卵巢对比图

Fig. 1 Comparison of ovaries after treatment with different doses of pregnant mare serum gonadotropin

a. 对照组; b. 50 IU 组; c. 70 IU 组; d. 90 IU 组。a. Control group; b. 50 IU group; c. 70 IU group; d. 90 IU group.

表 1 不同剂量孕马血清促性腺激素对卵巢形态的影响

Table 1 Effects of different doses of pregnant mare serum gonadotropin on ovarian morphology

测定项目 Parameters		对照组 Control group n = 6	50 IU 组 50 IU group n = 6	70 IU 组 70 IU group n = 6	90 IU 组 90 IU group n = 6
卵巢形态参数 Morphological parameters of the ovaries	重量 Weigh (g)	0.18 ± 0.07 ^D	0.32 ± 0.11 ^C	0.46 ± 0.23 ^B	0.58 ± 0.13 ^A
	长 Length (mm)	15.56 ± 2.89 ^b	17.45 ± 2.77 ^{ab}	18.40 ± 2.78 ^a	18.53 ± 2.29 ^a
	宽 Width (mm)	5.29 ± 0.75 ^B	5.67 ± 1.57 ^B	6.8 0 ± 1.36 ^A	7.37 ± 0.90 ^A
	厚 Thickness (mm)	3.96 ± 1.45 ^B	4.26 ± 0.80 ^B	4.91 ± 1.21 ^{AB}	5.60 ± 1.02 ^A
卵巢形态的增加率 (%) Increase rate of morphological indexes of the ovaries	重量 Weight	—	77.78	155.56	222.22
	长 Length	—	12.15	18.25	19.09
	宽 Width	—	7.18	28.54	39.32
	厚 Thickness	—	7.58	23.99	41.41

同行数据无标注或标注相同字母, 表示差异不显著 ($P \geq 0.05$), 数据标注不同小写字母, 表示差异显著 ($0.01 \leq P < 0.05$), 不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

If the peer data are not marked or the same letters are marked, the difference is not significant ($P \geq 0.05$), if the data are marked with different lowercase letters, the difference is significant ($0.01 \leq P < 0.05$), and if the upper case letters are marked, the difference is very significant ($P < 0.01$).

70 IU、90 IU 组极显著大于对照组, 因注射剂量的增加, 卵巢重极显著增大, 在 90 IU 达到最大 ($P < 0.01$); 卵巢宽 70 IU 和 90 IU 组极显著大于对照组和 50 IU 组 ($P < 0.01$); 卵巢厚 90 IU 组极显著大于对照组和 50 IU 组 ($P < 0.01$), 卵巢长 70 IU 和 90 IU 组显著大于对照组 ($P < 0.05$)。

2.2 胚胎的体外发育情况

本研究中获得的家兔胚胎卵裂球、透明带和层黏蛋白等结构清晰可见 (图 2b), 且经体

外培养可将早期胚胎分别培养至 2-细胞、4-细胞、8-细胞及桑椹胚阶段 (图 2b ~ f)。形态鉴定发现, 可用胚胎的卵裂球大小均匀整齐、排列较为紧凑、整体轮廓清晰, 色调透明度适中 (图 2a ~ f); 而劣质胚胎卵裂球大小、密度不均, 结构松散凌乱甚至破碎死亡, 整体轮廓不清晰, 色调发暗 (图 2g ~ i)。对照组和 50 IU、70 IU、90 IU 组获得的平均胚胎数分别为 5.2、8.4、21.8、17.1 枚, 70 IU 组的胚胎数极显著高于其他各组 ($P < 0.01$), 但 90 IU 组胚胎数

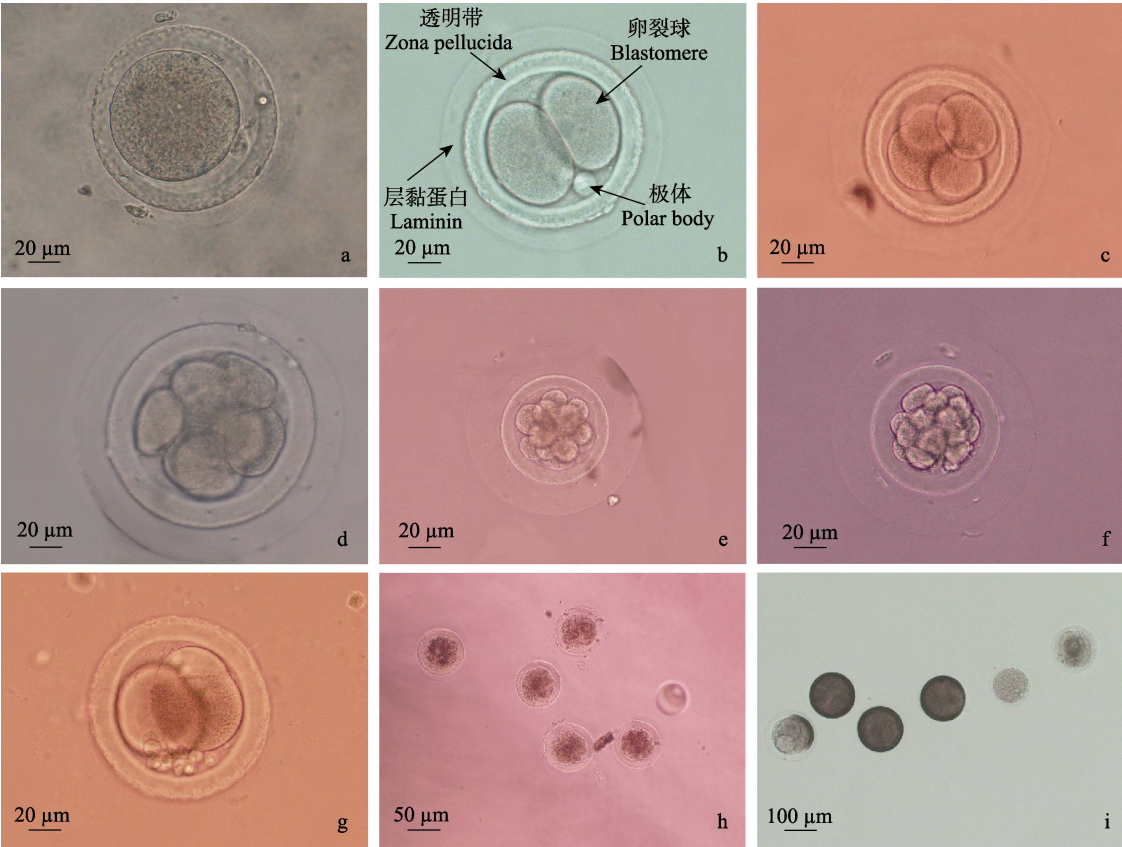


图 2 胚胎发育的不同阶段和形态

Fig. 2 Morphologies of embryos at different development stages

a. 受精卵; b. 2-细胞; c. 4-细胞; d. 8-细胞; e、f. 桑椹胚; g、h、i. 畸形胚胎。
a. Fertilized egg; b. 2-Cell; c. 4-Cell; d. 8-Cell; e, f. Morula; g, h, i. Abnormal embryo.

则降低，随 PMSG 注射剂量的增大，胚胎畸形率极显著增加 ($P < 0.01$)；在胚胎的体外培养中，70 IU 组获得的 2-细胞、4-细胞、8-细胞胚胎和桑椹胚均最多，分别为 7.8、6.8、5.8 和 4.6 枚。而体外培养的 2-细胞率对照组极显著高于其余各组 ($P < 0.01$)，4-细胞率对照组显著高于 90 U 组 ($P < 0.05$)，其余各组之间差异不显著 ($P > 0.05$)，8-细胞率、桑椹胚率各组之间差异不显著 ($P > 0.05$) (表 2)。

2.3 不同发育阶段卵泡直径的变化

在超排后的卵巢组织中能够观察到处于不同发育阶段的卵泡，如排列于卵巢皮质浅层的原始卵泡 (图 3a)、已有透明带出现的初级卵泡 (图 3b)、卵泡细胞增生为双层或多层的次

级卵泡 (图 3c)，以及形成卵泡腔的三级卵泡 (图 3d)。通过测定各级卵泡和卵母细胞的直径 (表 3)，原始卵泡直径各组之间差异不显著 ($P > 0.05$)，初级卵泡直径对照组极显著大于 50 IU、70 IU、90 IU 组，50 IU 组极显著大于 90 IU 组 ($P < 0.01$)；初级卵泡中卵母细胞直径 50 IU 组显著大于其余各组 ($P < 0.05$)；次级卵泡直径对照组极显著大于 70 IU、90 IU 组 ($P < 0.01$)，次级卵泡中卵母细胞直径对照组、50 IU、70 IU 组显著大于 90 IU 组 ($P < 0.05$)；三级卵泡直径对照组极显著大于其余各组，50 IU、70 IU 组极显著大于 90 IU 组 ($P < 0.01$)，三级卵泡中卵母细胞直径 90 IU 组显著大于对照组、50 IU 组 ($P < 0.05$)。

表 2 不同剂量孕马血清促性腺激素处理后胚胎卵裂率

Table 2 The embryo cleavage rate after treatment with different doses of pregnant mare serum gonadotropin

	对照组 Control group <i>n</i> = 6	50 IU 组 50 IU group <i>n</i> = 6	70 IU 组 70 IU group <i>n</i> = 6	90 IU 组 90 IU group <i>n</i> = 6
胚胎数 No. embryos	5.17 ± 1.47 ^D	8.42 ± 1.73 ^C	21.83 ± 2.66 ^A	17.08 ± 5.82 ^B
胚胎畸形率 Embryonic deformity rate (%)	6.45	17.82	18.70	38.54
2-细胞数 No. 2-cell	3.67 ± 1.56 ^B	3.25 ± 0.75 ^B	7.83 ± 2.08 ^A	4.33 ± 1.67 ^B
2-细胞率 2-cell rate (%)	73.08 ± 22.87 ^A	47.17 ± 8.29 ^B	44.17 ± 9.59 ^B	44.08 ± 14.93 ^B
4-细胞数 No. 4-cell	2.67 ± 1.44 ^B	2.92 ± 0.90 ^B	6.8 3 ± 1.70 ^A	3.25 ± 1.60 ^B
4-细胞率 4-cell rate (%)	52.33 ± 24.39 ^a	42.00 ± 9.79 ^{ab}	38.75 ± 8.40 ^{ab}	31.58 ± 10.21 ^b
8-细胞数 No. 8-cell	2.08 ± 1.31 ^B	2.42 ± 0.67 ^B	5.83 ± 1.75 ^A	2.92 ± 1.24 ^B
8-细胞率 8-cell rate (%)	39.75 ± 20.06	35.08 ± 6.95	33.67 ± 10.85	29.00 ± 8.63
桑椹胚数 No. morula	1.75 ± 1.36 ^B	1.92 ± 0.51 ^B	4.58 ± 1.73 ^A	2.17 ± 1.47 ^B
桑椹胚率 Morula rate (%)	32.50 ± 23.48	28.76 ± 8.47	26.08 ± 8.55	20.50 ± 12.70

同行数据无标注或标注相同字母，表示差异不显著 ($P \geq 0.05$)，数据标注不同小写字母，表示差异显著 ($0.01 \leq P < 0.05$)，不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

If the peer data are not marked or the same letters are marked, the difference is not significant ($P \geq 0.05$), if the data are marked with different lowercase letters, the difference is significant ($0.01 \leq P < 0.05$), and if the upper case letters are marked, the difference is very significant ($P < 0.01$).

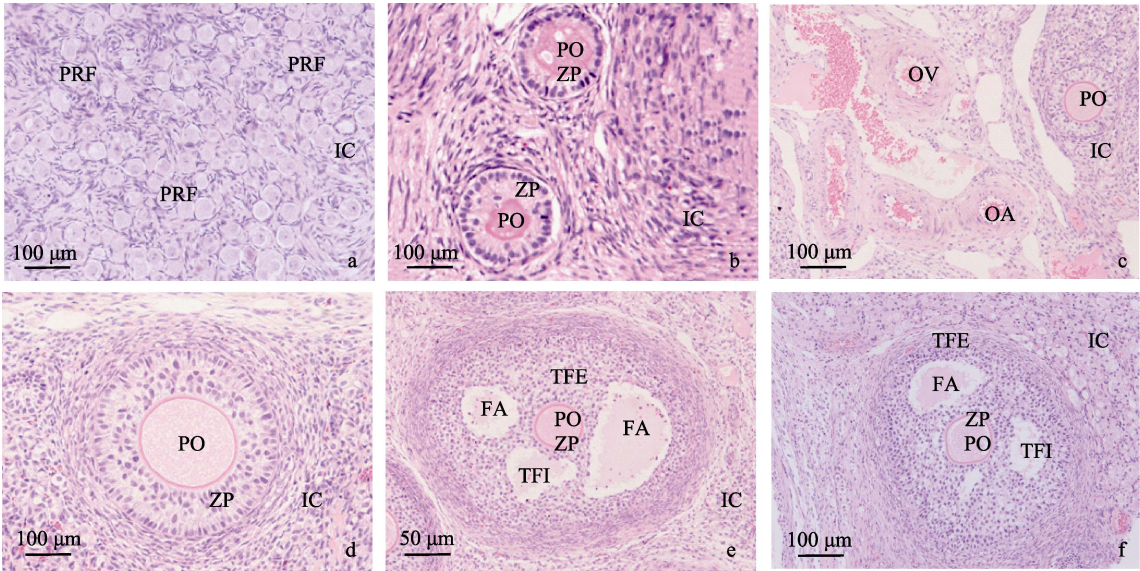


图 3 不同发育阶段的卵泡

Fig. 3 The follicles at different stages

a. 原始卵泡；b. 初级卵泡；c、d. 次级卵泡；e、f. 三级卵泡。FA. 卵泡腔；IC. 间质细胞；OA. 卵巢动脉；OV. 卵巢静脉；PO. 初级卵母细胞；PRF. 原始卵泡；SG. 颗粒层；TFE. 卵泡外层；TFI. 卵泡内层；ZP. 透明带

a. Primordial follicles; b. Primary follicles; c, d. Secondary follicles; e, f. Tertiary follicle. FA. Follicular cavity; IC. Interstitial cell; OA. Ovarian artery; OV. Ovarian vein; PO. Primary oocyte; PRF. Primitive follicles; SG. Stratum granulosum; TFE. Theca folliculi externa; TFI. Theca folliculi intern; ZP. Zona pellucida

表 3 超排处理后不同阶段卵泡和卵母细胞的直径 (μm)

Table 3 Diameters of follicles and oocytes at different stages after superovulation treatment

	对照组 Control group n = 6	50 IU 组 50 IU group n = 6	70 IU 组 70 IU group n = 6	90 IU 组 90 IU group n = 6
原始卵泡直径 Diameter of primordial follicle	32.33 ± 6.30	31.15 ± 4.90	29.67 ± 4.14	29.76 ± 4.24
初级卵泡直径 Diameter of primary follicle	95.20 ± 9.34 ^A	80.23 ± 17.33 ^B	74.85 ± 16.12 ^{BC}	69.26 ± 6.53 ^C
卵母细胞直径 Oocyte diameter	48.35 ± 7.32 ^b	56.37 ± 7.15 ^a	49.47 ± 9.54 ^b	49.48 ± 4.64 ^b
次级卵泡直径 Diameter of secondary follicle	208.92 ± 68.32 ^A	181.50 ± 50.25 ^{AB}	168.32 ± 40.61 ^B	155.02 ± 14.94 ^B
卵母细胞直径 Oocyte diameter	90.28 ± 19.22 ^a	89.19 ± 19.62 ^a	86.68 ± 21.90 ^a	70.96 ± 20.07 ^b
三级卵泡直径 Diameter of tertiary follicle	781.37 ± 170.63 ^A	675.27 ± 101.54 ^B	642.94 ± 67.38 ^B	475.63 ± 61.01 ^C
卵母细胞直径 Oocyte diameter	99.15 ± 15.07 ^c	108.36 ± 8.04 ^{bc}	119.16 ± 26.48 ^{ab}	120.85 ± 20.67 ^a

同行数据无标注或标注相同字母，表示差异不显著 ($P \geq 0.05$)，数据标注不同小写字母，表示差异显著 ($0.01 \leq P < 0.05$)，不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

If the peer data are not marked or the same letters are marked, the difference is not significant ($P \geq 0.05$), if the data are marked with different lowercase letters, the difference is significant ($0.01 \leq P < 0.05$), and if the upper case letters are marked, the difference is very significant ($P < 0.01$).

2.4 不同类型卵泡数的比较

对照组、50 IU、70 IU 和 90 IU 组中卵巢中的原始卵泡、初级卵泡和次级卵泡数在各组间差异不显著 ($P > 0.05$)；三级卵泡数、卵泡优势化率 70 IU 组显著高于对照组、50 IU 和 90 IU 组 ($P < 0.05$)，其余各组之间差异不显著 ($P > 0.05$) (表 4)。

3 讨论

3.1 不同浓度 PMSG 处理后家兔卵巢的形态变化

本研究显示，在 HCG 定量为 100 IU 时，

PMSG 注射剂量为 50 IU 和 70 IU 时，70 IU 家兔卵巢的重量、体积比 50 IU 组明显增大，且表面的充血卵泡也有所增加，该特征与其他学者对家兔的研究结果一致 (刘平等 2010)。耿娟等 (2014) 利用 B 超观测超排处理后荷斯坦奶牛的卵巢，发现超排处理后奶牛的卵巢逐步增大。Kim 等 (2021) 发现，PMSG/HCG 处理能促使小鼠 (*Mus musculus*) 卵泡生长，血管丰盈，卵巢体积增大。Somanjaya 等 (2021) 对羊 (*Ovis aries*) 的超排实验也发现类似结果。这是由于 PMSG 能促进卵巢上大量的卵泡生长发育，使卵巢血液供应量增大，血管增生，

表 4 不同浓度 PMSG 对各级卵泡个数的影响

Table 4 Effects of different concentrations of PMSG on the number of follicles at all levels

组别 Group	原始卵泡数 Number of primordial follicles	初级卵泡数 Number of primary follicles	次级卵泡数 Number of secondary follicles	三级卵泡数 Number of tertiary follicles	三级卵泡数/原始卵泡数 Number of tertiary follicles/Number of primordial follicles (%)
对照组 Control group	24.40 ± 20.86	2.70 ± 2.36	1.30 ± 0.48	0.40 ± 0.70 ^b	1.64 ^b
50 IU 组 50 IU group	23.20 ± 10.54	2.80 ± 1.40	2.10 ± 0.87	0.70 ± 0.67 ^b	3.02 ^b
70 IU 组 70 IU group	24.20 ± 7.04	3.00 ± 1.25	2.40 ± 1.51	1.40 ± 0.70 ^a	5.79 ^a
90 IU 组 90 IU group	26.20 ± 22.58	3.40 ± 2.37	1.90 ± 0.99	0.30 ± 0.76 ^b	1.15 ^b

同列数据无标注或标注相同字母，表示差异不显著 ($P \geq 0.05$)，数据标注不同小写字母，表示差异显著 ($0.01 \leq P < 0.05$)。

If the peer data are not marked or the same letters are marked, the difference is not significant ($P \geq 0.05$), if the data are marked with different lowercase letters, the difference is significant ($0.01 \leq P < 0.05$).

为卵泡发育提供更多营养物质,同时卵巢基质增加,从而使卵巢有增大的趋势(Wurtman 1964)。但在超排处理的过程中,PMSG 过量又会导致卵巢超负荷运转而产生不良影响,如充血卵泡增多、排卵点降低甚至发生囊肿或病变等卵巢过刺激反应(Crispo et al. 2021)。本实验中卵巢表面的充血卵泡数在 90 IU 的实验组增多,说明此时卵巢出现了过刺激反应,影响了超排效果。

3.2 不同浓度 PMSG 处理后胚胎体外培养情况

胚胎质量与配子质量密切相关,特别是卵对受精率及胚胎后续发育有着重要影响,超排处理可使动物在一个排卵周期内获得更多的卵,这是因为外源性激素的刺激使一些本要凋亡的卵获得了生长的机会,这其中就有可能存在一些内在缺陷的卵,因此超排处理后的胚胎质量也受到一定的影响(于文娟 2020)。本研究显示,超排处理后虽可获得更多的可用胚胎,但将早期胚胎体外培养时发现,胚胎质量和发育状况在各组间存在差异。当 HCG 定量为 100 IU,随着 PMSG 注射剂量的增大,各时期的胚胎卵裂率逐渐下降,胚胎畸形率依次显著上升。王田娟等(2011)发现,随 PMSG 处理浓度的增加,获得的家兔卵数目减少且出现卵周间隙变大、胞浆形态异常等现象,因此建议适宜的 PMSG 浓度应在 60~80 IU 之间。本研究中 90 IU 组获得的胚胎数减少,胚胎畸形率上升,各时期卵裂率下降,分析此现象,可能是由于 PMSG 半衰期过长,使用后存在后效应,过量处理易引发卵巢囊肿,出现大量不排卵卵泡,从而降低了获得卵子数目,且由于过刺激反应致使卵子发育不正常,并可能分泌不利于早期胚胎发育的雌激素,造成卵周围环境的改变,进一步对卵子质量产生不良影响;另外也是由于 PMSG 具有促卵泡素(follicle-stimulating hormone, FSH)和促黄体素(luteinizing hormone, LH)的双重生物学效应,而不恰当的促黄体素出现也可能使卵过早成熟而老化,

影响后期胚胎质量(叶联顺等 2003,白园园等 2020)。吴银玲(2016)用 0~10 IU 的 PMSG 处理小鼠,发现小鼠胚胎总数随激素浓度依次增多,胚胎畸形率也依次升高,且在 7.5 IU 时获得总可用胚胎最多,继续增加 PMSG 浓度胚胎数量和质量均有所下降,该趋势与本实验结果一致。同时本研究中,随着 PMSG 浓度的增加,体外培养早期胚胎,各时期的卵裂率依次降低,尤其是对 2-细胞期胚胎卵裂率影响差异极显著,对 4-细胞期胚胎影响差异显著。分析原因,可能是外源性激素组合 PMSG/HCG 诱导氧化应激反应,随着胚胎的发育,活性氧渐渐积累到一定程度便可影响胚胎质量和胚胎发育(Park et al. 2015)。因此在超排的实际应用中应谨慎考虑 PMSG/HCG 的浓度范围。

3.3 不同浓度 PMSG 处理后家兔卵巢的组织结构变化

随着动物的生长发育,初级卵母细胞逐渐发育成熟,而作为卵子发育的特殊微环境,卵泡的发育情况直接影响着卵子的数量和质量(朱士恩 2009)。有研究表明,PMSG 具有刺激卵巢活性并促使卵泡生长发育的功效(康爱君等 1999),而卵泡的大小也直接影响着卵母细胞的发育情况,从而影响卵子质量。也有研究表明,卵泡过大或过小均影响卵母细胞的成熟率,中等大小的卵泡中卵母细胞成熟率最高,且中等大小卵泡内的优质卵母细胞中,具有三个以上完整卵丘细胞的卵母细胞具有更好的体外成熟和卵裂能力(Zhang et al. 2016)。本实验结果显示,卵母细胞的直径在初级卵泡、次级卵泡中的变化无规律,但在三级卵泡中随着激素处理浓度的增加而增大;激素处理对原始卵泡大小和数目的影响均不显著;随着 PMSG 浓度的增加,初级卵泡、次级卵泡和三级卵泡的直径依次减小。而初级卵泡数和次级卵泡数的变化差异不显著,但三级卵泡数在 70 IU 组中最多,且显著多于其他组。陈龙等(2010)用 PMSG 处理绵羊,发现随着 PMSG 浓度的递增,绵羊卵巢中卵泡直径减小,这与本实验趋势相

似。Duggavathi 等 (2003) 的研究表明, 卵泡发育过程中卵泡发生募集及选择, 之后在 FSH 和 LH 的调节下使其发育成熟并排卵, 反之, 得不到充足 FSH 和 LH 的卵泡将无法进一步生长从而闭锁退化。本研究发现, 在适宜的 PMSG 处理浓度下, 家兔卵泡优势化率显著高于对照组, 说明 PMSG/HCG 激素组合能够显著促进原始卵泡的优势化, 同时降低了卵泡闭锁。这可能是由于 PMSG 同时具备 FSH 和 LH 的生物学效应, 而 HCG 具有与 LH 相似的生殖调节作用 (Agca et al. 2006), 两者组合使用缓解了家兔卵泡闭锁。

参 考 文 献

- Agca C, Ries J E, Kolath S J, et al. 2006. Luteinization of porcine preovulatory follicles leads to systematic changes in follicular gene expression. *Reproduction*, 132(1): 133–145.
- Aguiar F, Gdaga D, Alves K A, et al. 2020. Supportive techniques to investigate *in vitro* culture and cryopreservation efficiencies of equine ovarian tissue: A review. *Theriogenology*, 156: 296–309.
- Crispo M, Meikle M N, Schlapp G, et al. 2021. Ovarian superstimulatory response and embryo development using a new recombinant glycoprotein with eCG-like activity in mice. *Theriogenology*, 164(164): 31–35.
- Duggavathi R, Bartlewski P M, Barrett D, et al. 2003. Use of high-resolution transrectal ultrasonography to assess changes in numbers of small ovarian antral follicles and their relationships to the emergence of follicular waves in cyclic ewes. *Theriogenology*, 60(3): 495–510.
- Kim S H, Yoon J T. 2021. Morphological changes in mouse ovary due to hormonal hypersecretion and matrix metalloproteinase-2 activity. *Histol and Histopathol*, 36(5): 527–534.
- Park S J, Kim T S, Kim J M, et al. 2015. Repeated superovulation via PMSG/hCG administration induces 2-Cys peroxiredoxins expression and overoxidation in the reproductive tracts of female mice. *Molecules and Cells*, 38(12): 1071–1078.
- Somanjaya R, Fuah A M, Rahayu S, et al. 2021. PMSG in ewes: A practical and efficient step for superovulation. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 748(1): 11.
- Torres-Simental J F, Peña-Calderón C, Avendaño-Reyes L, et al. 2021. Predictive markers for superovulation response and embryo production in beef cattle managed in northwest Mexico are influenced by climate. *Livestock Science*, (1): 104–590.
- Wurtman R J. 1964. An effect of luteinizing hormone on the fractional perfusion of the rat ovary. *Endocrinology*, (6): 927–933.
- Zhang J J, Yang M, Merhi Z. 2016. Reproductive potential of mature oocytes after conventional ovarian hyperstimulation for *in vitro* fertilization. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 133(2): 230–233.
- 白园园, 王净. 2020. 孕马血清促性腺激素在羊繁殖中的应用. *中国畜禽种业*, 16(1): 83.
- 陈龙, 房义, 郝海生, 等. 2010. 绵羊同期发情中用不同 PMSG 剂量处理的卵巢反应 // 中国畜牧兽医学动物繁殖学分会. 中国畜牧兽医学动物繁殖学分会第十五届学术研讨会论文集. 天津: 中国畜牧兽医学动物繁殖学分会第十五届学术研讨会, 4.
- 耿娟, 赵云程, 陈静波. 2014. 运用 B 超技术观测超排期间荷斯坦牛卵巢动态变化的研究. *中国奶牛*, (10): 22–25.
- 康爱君, 张丽芳, 田枫, 等. 1999. 超数排卵后小鼠卵巢和子宫的组织学观察. *上海实验动物科学*, 19(3): 173.
- 李子义, 周琪, 文兴豪, 等. 1997. 家兔的超数排卵. *东北农业大学学报*, 28(3): 67–72.
- 刘平, 吕占军, 李明辉, 等. 2010. 不同剂量的外源激素对休情期母猪卵巢组织的影响. *东北农业大学学报*, 41(2): 112–115.
- 罗昊澍, 张佳伟, 师磊, 等. 2021. 生殖激素产品的应用和发展趋势. *猪业科学*, 38(5): 58–60.
- 任俊光, 刘佳, 李勇, 等. 2021. 乌骨羊超数排卵效果的研究. *当代畜禽养殖业*, (4): 46–47.
- 田凤林, 宋学功, 邓树义. 2020. 不同剂量生殖激素对小鼠超排效果的影响. *中国奶牛*, (3): 27–29.
- 王田娟, 章志国, 邢琼, 等. 2011. 不同超排方法对家兔超数排卵效果的影响. *安徽医科大学学报*, 46(4): 355–357, 399.
- 吴银玲. 2016. 小鼠超数排卵后胚胎质量评价. 保定: 河北大学硕士学位论文.
- 杨小淦, 江明生, 卢晟盛, 等. 2006. 家兔超数排卵的研究. *广西农业生物科学*, (增刊 1): 73–77.
- 叶联顺, 计垣, 吕静, 等. 2003. HMG 在家兔超数排卵中的应用.