

培養液中添加生長素和血紅素對體外成熟與體 外培養牛卵母細胞發育能力之影響⁽¹⁾

楊鎮榮⁽¹⁾ 蕭振文⁽²⁾ 曲鳳翔⁽²⁾ 沈朋志⁽²⁾ 李善男⁽²⁾⁽³⁾

收件日期：91 年 3 月 28 日；接受日期：91 年 9 月 12 日

摘 要

本試驗旨在探討牛卵母細胞於體外成熟過程中添加不同濃度之豬生長素，及體外培養過程中添加不同濃度之牛血紅素，對牛卵母細胞發育能力之影響，以提昇體外生產系統之效率。

自屠宰場取得乳牛與黃牛卵巢攜回試驗室後，立即抽取卵丘－卵母細胞複合體（cumulus-oocyte complex；COC）進行試驗。結果發現，添加豬生長素 0.01、0.1 與 1 $\mu\text{g/ml}$ 對牛卵母細胞之卵裂率分別為 56.0%、55.1%與 51.9%，均顯著高於對照組之 43.3%（ $P < 0.05$ ）。添加牛血紅素 0.01 與 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 組發育至桑椹胚與囊胚之百分率分別為 16.7%與 15.2%，顯著高於對照組之 12.1%（ $P < 0.05$ ）；而添加牛血紅素 1 $\mu\text{g/ml}$ 組發育至桑椹胚與囊胚之百分率為 8.2%，則顯著低於對照組（ $P < 0.05$ ）。試驗結果顯示，牛卵母細胞體外成熟時，於培養液中添加豬生長素 0.01、0.1 與 1 $\mu\text{g/ml}$ ，可促進其卵裂率，而於體外受精後之培養過程中，添加牛血紅素 0.01 與 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 則有促進牛胚發育至桑椹胚與囊胚之能力。本試驗之結果將可供牛卵母細胞體外成熟培養之參考。

關鍵詞：生長素、血紅素、牛卵母細胞、體外發育。

緒 言

在家畜基因轉殖、核轉殖、胚分割技術之開發過程中，均需大量之卵母細胞及早期胚之配合，雖然應用活體之超級排卵和人工授精技術可增加一部分卵母細胞及胚之來源，但在數量上及經濟層面之考量，仍受相當之限制，若能自屠宰場收集廢棄之卵巢，將可取得大量供試驗操作之卵母細胞。因此，卵母細胞之體外成熟、體外受精和胚之體外培養技術之建立，尤顯重要。

源自腦下垂體前葉所分泌之生長素，可調節體內各器官與組織之生長與分化。Spicer *et al.* (1992) 指出生長素具增加豬卵巢重量及小型濾泡數之能力；以生長素注射母牛，亦証實可增加該母牛卵巢表面之濾泡數（de la Sota *et al.*, 1993）及排卵數（Gong *et al.*, 1993）。在胚體外生產之過程則發現，於培養液中添加適量之生長素，可促進牛卵母細胞核之成熟及其於受精後發育至囊胚之百分比

- (1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1136 號。
- (2) 行政院農業委員會畜產試驗所生理組。
- (3) 通訊作者。

(Izadyar *et al.*, 1996; Iga *et al.*, 1998); 類似試驗亦顯示, 培養液中添加生長素對牛卵母細胞之細胞質成熟作用和其後之受精率具明顯之助益 (Izadyar *et al.*, 1998)。

哺乳動物胚於體外培養時, 已知皆會發生發育受阻之現象, 此即所謂之發育阻滯期 (block stage)。而牛胚於體外培養之發育阻滯期發生在 8~16 細胞期 (Eyestone and First, 1986)。近年, 應用細胞共培養 (co-culture) 技術已可突破此限制, 並可發育至囊胚階段 (李等, 1997; Rexroad, 1989), 且經胚移置後成功分娩小牛 (沈及李, 1999)。Goto *et al.* (1988) 及 Fukuda *et al.* (1990) 即利用牛卵丘細胞予以共培養, 待受精卵發育至囊胚後進行移置並成功產仔。惟利用卵丘細胞共培養之過程中會產生一氧化氮 (nitric oxide, NO), 而降低所培養之卵母細胞於體外受精後之後續發育能力。若於培養液中添加適量之血紅素, 其能與一氧化氮產生緊密結合, 則可防止此危害作用, 進而提昇卵母細胞體外受精後發育至囊胚之百分率 (Lim and Hansel, 1998; Lim *et al.*, 1999)。故本試驗旨在探討於體外成熟與體外培養過程中, 分別添加不同濃度之豬生長素與牛血紅素, 以瞭解其對於牛胚體外生產發育能力之影響。

材料與方法

I. 試驗材料

自屠宰場取得黃牛或乳牛卵巢, 以 0.9% 生理食鹽水攜回試驗室後, 先以 18 號針頭之 1 ml 針筒抽取卵巢表面直徑約 2~8 mm 濾泡內之卵丘-卵母細胞複合體, 取得之卵丘-卵母細胞複合體依外圍卵丘細胞所包圍之層數進行等級評比後, 僅取一、二級卵丘-卵母細胞複合體進行體外成熟、體外受精與體外培養等試驗。

II. 試驗方法

(i) 添加豬生長素對體外成熟之影響

取得之一、二級卵丘-卵母細胞複合體隨機置入對照組 (TCM 199 含 5 % FCS) 與處理組 (TCM 199 含 5 % FCS, 並添加豬生長素 0.01、0.1 與 1 $\mu\text{g/ml}$, Porcine growth hormone, pGH, Sigma S-8648) 之成熟培養液中, 於 38.5°C、2 % CO₂ 與相對濕度 95 % 之培養條件下, 進行 24~26 小時的體外成熟培養。成熟培養後之卵丘-卵母細胞複合體經去除外圍之卵丘細胞後, 以解凍之冷凍精液進行體外受精, 受精 8 小時後洗去多餘精子, 兩組均移入未添加豬生長素之培養液中, 與單層之卵丘細胞進行共培養。受精後每隔 24 小時觀察受精卵之卵裂情形, 以瞭解培養液中添加不同濃度之豬生長素對牛卵母細胞體外成熟之影響。

(ii) 添加牛血紅素對體外培養之影響

取得之一、二級卵丘-卵母細胞複合體先行培養於 TCM199 含 5% FCS 之成熟培養液中, 體外成熟之培養環境與體外受精之條件同試驗一所述。完成體外受精後, 受精卵隨機分成對照組 (未含牛血紅素) 和處理組 (含牛血紅素 0.01、0.1 與 1 $\mu\text{g/ml}$ Bovine hemoglobin, bHB, Sigma H-2500), 並與卵丘細胞於前述之培養環境中進行共培養, 以瞭解不同濃度的牛血紅素對牛胚體外發育能力之影響。培養過程中每隔 24 小時觀察並評估各組牛胚發育至各胚期之百分比, 以瞭解培養液中添加不同濃度之牛血紅素對牛胚體外發育能力之影響。

III. 統計分析：

試驗之對照組與處理組間卵裂率之差異顯著性採用卡方測驗 (χ^2 test) 進行統計分析。

結果與討論

I. 添加豬生長素對體外成熟之影響

本試驗對照組與處理組添加豬生長素 0.01、0.1 與 1 $\mu\text{g/ml}$ 之試驗次數、卵母細胞進行體外受精之數量，及受精後之卵裂率結果如表 1 所示。本試驗之對照組共計進行 16 次試驗，經體外成熟後進行體外受精之卵丘與卵母細胞複合體共計 104 個，卵裂率為 43.3%；處理組添加豬生長素 0.01、0.1 與 1 $\mu\text{g/ml}$ 則分別進行 17、18 與 16 次試驗，體外成熟後進行體外受精之卵丘與卵母細胞複合體則分別有 84、81 與 77 個，卵裂率則分別為 56.0%、55.1%與 51.9%，均顯著高於對照組 43.3% ($P < 0.05$)。

表 1. 體外成熟過程中添加豬生長素對牛卵母細胞卵裂率之影響

Table 1. Effects of porcine growth hormone supplementation on the cleavage rate of bovine oocytes during *in vitro* maturation

Treatments	Control	Porcine growth hormone conc. ($\mu\text{g/ml}$)		
		0.01	0.1	1
No. of trails	16	17	18	16
No. of oocytes for IVF	104	84	81	77
Cleavage rate * (%)	43.3 ^a	56.0 ^b	55.1 ^b	51.9 ^b

^{a, b} Means in the same row with different superscripts were significantly different ($P < 0.05$).

* Cleavage rate = No. of oocytes developed above 2-cell stage / No. of oocytes for IVF.

卵巢的濾泡生成作用 (folliculogenesis)、固醇類合成作用 (steroidogenesis) 與卵母細胞成熟的機制中，除受腦下腺垂體所分泌的激性腺素之調控外，同屬於腦下腺垂體前葉所分泌之生長素，亦扮演著重要的角色，因為在卵巢表面存在有生長素之受體，此在大鼠 (Lobie *et al.*, 1990) 與牛 (Lucy *et al.*, 1993) 均已發現，因此認為卵巢為生長素作用的標的器官之一 (Webb *et al.*, 1994; Izadyar *et al.*, 1999)。是故在牛卵母細胞體外成熟過程中，添加生長素有輔助卵母細胞核成熟，提昇卵裂率與胚之發育能力 (Izadyar *et al.*, 1998)。生長素之作用機制在大鼠是經由 IGF-1 路徑 (Apa *et al.*, 1994)，在牛則是經由活化 c-AMP 路徑，調節卵母細胞對葡萄糖、脂質與蛋白質的代謝，並促進卵母細胞成熟及提昇其卵裂率與發育能力 (Gluckman *et al.*, 1987; Izadyar *et al.*, 1999)。Izadyar *et al.* (1996; 1998) 之研究報告即指出，於牛卵母細胞體外成熟過程中添加生長素，對於卵丘與卵母細胞複合體之直徑、卵母細胞發育至 metaphase II、受精後卵裂率及發育至囊胚之百分率，確實有顯著提昇之效用。本試驗結果亦證實體外成熟過程中添加豬生長素對卵裂率確有提昇之效果，可提昇牛胚體外生產效率。

本試驗之卵巢係自屠宰場取得，因無法確知提供牛隻之生殖背景、內分泌背景與健康背景等生殖生理資料，將來若能輔以超音波探頭自體內取卵 (ovum pick-up, OPU) 技術 (Pieterse *et al.*, 1998)，自體內取得品質優良之卵母細胞取代自屠宰場取得卵巢之方式，將可改善牛卵母細胞體外生產系統，並且提昇牛胚之體外生產效率，此為未來努力的重點之一。

II. 添加牛血紅素對體外培養之影響

本試驗之對照組與處理組添加牛血紅素 0.01、0.1 與 1 $\mu\text{g/ml}$ 之試驗次數、一、二級卵丘—卵母細胞複合體數、體外培養後之卵裂率、發育至 2~4 細胞期、8~16 細胞期與桑椹胚與囊胚期之結果如表 2 所示。本試驗之對照組共計進行 16 次試驗，取得可用之卵丘與卵母細胞複合體共計 107 個；處理組添加牛血紅素 0.01、0.1 與 1 $\mu\text{g/ml}$ 則分別進行 18、16 與 17 次試驗，取得可用之卵丘與卵母細胞複合體則分別有 126、105 與 110 個。經體外受精與體外培養後，對照組之卵裂率為 62.6%，處理組添加牛血紅素 0.01、0.1 與 1 $\mu\text{g/ml}$ 之卵裂率則分別為 61.1%、66.7%與 58.2%，彼此間未有顯著差異。然若將牛胚之發育分成 2~4 細胞期、8~16 細胞期、桑椹胚+囊胚期三階段進行比較，則發現當發育至 2~4 細胞時，添加牛血紅素 0.01 $\mu\text{g/ml}$ 之百分率為 22.2%，顯著低於對照組之 29.0%，及添加牛血紅素 0.1 與 1 $\mu\text{g/ml}$ 組之 28.6%與 31.8% ($P<0.05$)；而發育至 8~16 細胞期時，則添加牛血紅素 1 $\mu\text{g/ml}$ 之百分率為 18.2%，顯著低於對照組之 21.5%，及添加牛血紅素 0.01 與 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 組之 22.2%與 22.9% ($P<0.05$)；而發育至桑椹胚與囊胚期時，則添加牛血紅素 0.01 與 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 之 16.7%與 15.2%，顯著優於對照組之 12.1% ($P<0.05$)，添加牛血紅素 1 $\mu\text{g/ml}$ 之 8.2%則又顯著低於對照組之 12.1% ($P<0.05$)。試驗結果顯示，體外培養過程中添加牛血紅素 0.01 與 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 組發育至桑椹胚與囊胚期之百分率分別為 16.7%與 15.2%，優於對照組之 12.1%，顯示培養液中添加牛血紅素 0.01 與 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 對於牛胚於體外培養過程中，具有促進牛胚發育至桑椹胚與囊胚之能力；然而當添加牛血紅素 1 $\mu\text{g/ml}$ 時則有抑制現象，此高濃度劑量不適用於體外培養系統之添加。

表 2. 體外培養過程中於培養液中添加不同濃度之牛血紅素對牛胚體外發育能力之影響

Table 2. Effects of bovine hemoglobin supplementation on the developmental competence of bovine embryo during *in vitro* culture

Treatments	Control	Bovine hemoglobin conc. ($\mu\text{g/ml}$)		
		0.01	0.1	1
No. of trials	16	18	16	17
No. of grade I + II COCs	107	126	105	110
Cleavage rate* (%)	62.6 ^a	61.1 ^a	66.7 ^a	58.2 ^a
Embryo developed to				
2~4 cell stage (%)	29.0 ^a	22.2 ^b	28.6 ^a	31.8 ^a
8~16 cell stage (%)	21.5 ^a	22.2 ^a	22.9 ^a	18.2 ^b
Morula+Blastocyst (%)	12.1 ^a	16.7 ^b	15.2 ^b	8.2 ^c

a, b, c Means in the same row with different superscripts were significantly different ($P < 0.05$).

* Cleavage rate = No. of oocytes developed above 2-cell stage / No. of oocytes for IVF.

在胚體外培養過程中常使用共培養或添加物質，以有效促進胚於體外培養之發育能力，然而在培養過程中，因共培養之卵丘細胞或粒性細胞（granulosa cell）均會代謝產生之一氧化氮，而培養環境中一氧化氮濃度升高，導致卵母細胞於體外受精後發育能力之降低，此時若於培養液中添加適量之血紅素，其扮演著一氧化氮清除者的角色，則可與一氧化氮產生緊密結合而移除培養環境中之一氧化氮濃度，提昇卵母細胞於體外受精後發育至囊胚之百分率（Lim and Hansel, 1998）。在培養液中添加血紅素可降低培養環境之一氧化氮濃度，Lim *et al.* (1999) 亦同時併用添加 L- ω -nitro-L arginine methyl ester (L-NAME) 以抑制一氧化氮之合成，然而對於牛胚體外發育能力並未有加成的效果，顯示只要能移除培養環境中之一氧化氮濃度，即可促進牛胚之體外發育能力。本試驗結果亦證實，培養液中添加牛血紅素確實可增加體外胚發育至桑椹胚

與囊胚之百分率，未來可用以改善牛胚體外生產之效率。雖然一氧化氮在體外培養中會抑制胚胎外發育能力，然而在若干研究報告中發現在濾泡發育過程中，一氧化氮具有調節卵巢排卵與類固醇生合成作用之功能（Matsumi *et al.*, 1998；Matsumi *et al.*, 2000），甚至在懷孕期中一氧化氮濃度亦隨之增加，而至懷孕末期才減少（Sladex *et al.*, 1997），顯示一氧化氮扮演著多樣生理的功能，此猶待深入探究。

參考文獻

- 李善男、劉振發、許義明。1997。經體外成熟和體外受精之牛卵母細胞與卵丘細胞共培養之發育率。中畜會誌 24:429~438。
- 沈朋志、李善男。1999。大型優勢濾泡之有無對源自同一卵巢內小型腔狀濾泡之台灣黃牛卵母細胞體外發育能力之影響。中畜會誌 28:461~470。
- Apa, R., A. Lanzone, F. Miceli, M. Mastrandrea, A. Caruso, S. Mancuso and R. Canipari. 1994. Growth hormone induces *in vitro* maturation of follicle- and cumulus-enclosed rat oocytes. Mol. Cell Endocrinol. 106:207~212.
- De La Sota, R. L., M. C. Lucy, C. R. Staples and W. W. Thatcher. 1993. Effects of recombinant bovine somatotropin (somatotribove) on ovarian function in lactating and nonlactating dairy cows. J. Dairy Sci. 76:1002~1013.
- Eyestone, W. H. and N. L. First. 1986. A study of the 8- to 16-cell developmental block in bovine embryos cultured *in vitro*. Theriogenology 25:152. (abstr.)
- Fukuda, Y., M. Ichikawa, K. Naito and Y. Toyoda. 1990. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized, and cultured with cumulus cell *in vitro* up to the blastocyst stage. Biol. Reprod. 42:114~119.
- Gluckman, P. D., B. H. Breier and S. R. Davis. 1987. Physiology of somatotrophic axis with particular reference to the ruminant. J. Dairy Sci. 70:442~466.
- Gong, J. G., T. A. Bramley, I. Wilmut and R. Webb. 1993. The effect of recombinant bovine somatotropin on the superovulatory response to pregnant mare serum gonadotropin in heifers. Biol. Reprod. 48:1141~1149.
- Goto, K., Y. Kajihara, S. Kosaka, M. Koba, Y. Naskanishi and K. Ogawa. 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of *in vitro* matured follicular oocytes. J. Reprod. Fertil. 83:753~758.
- Iga, K., K. Niwa and A. Bartke. 1998. Recombinant bovine growth hormone stimulates nuclear maturation of bovine oocytes *in vitro* and promotes subsequent embryonic development. J. Reprod. Dev. 44:45~52.
- Izadyar, F., B. Colenbrander and M. M. Bevers. 1996. *In vitro* maturation of bovine oocytes in the presence of growth hormone accelerates nuclear maturation and promotes subsequent embryonic development. Mol. Reprod. Dev. 45:372~377.
- Izadyar, F., W. J. Hage, B. Colenbrander and M. M. Bevers. 1998. The promotory effect of growth hormone on the developmental competence of *in vitro* matured bovine oocytes is due to improved cytoplasmic maturation. Mol. Reprod. Dev. 49:444~453.
- Izadyar, F., J. Zhao, H. T. A. Van Tol, B. Colenbrander and M. M. Bevers. 1999. Messenger RNA

- expression and protein localization of growth hormone in bovine ovarian tissue and in cumulus oocyte complexes (COCs) during *in vitro* maturation. *Mol. Reprod. Dev.* 53:398~406.
- Lim, J. M. and W. Hansel. 1998. Improved development of *in vitro*-derived bovine embryos by use of a nitric oxide scavenger in a cumulus-granulosa cell co-culture system. *Mol. Reprod. Dev.* 50:45~53.
- Lim, J. M., Y. Mei, B. Chen, R. A. Godke and W. Hansel. 1999. Development of bovine IVF oocytes cultured in medium supplemented with nitric oxide scavenger or inhibitor in a co-culture system. *Theriogenology* 51:941~949.
- Lobie, P. E., W. Breipohl, J. G. Aragon and M. J. Waters. 1990. Cellular localization of the growth hormone receptor/binding protein in the male and female reproductive systems. *Endocrinology* 126:2214~2221.
- Lucy, M. C., R. J. Collier, M. L. Kitchell, J. J. Dibner, S. D. Hauser and G. G. Krivi. 1993. Immunohistochemical and nucleic acid analysis of somatotropin receptor population in the bovine ovary. *Biol. Reprod.* 48:1219~1227.
- Matsumi, H., T. Yano, T. Koji, T. Ogura, O. Tsutsumi, Y. Taketani and H. Esumi. 1998. Expression and localization of inducible nitric oxide synthase in the rat ovary: A possible involvement of nitric oxide in the follicular development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243:67~72.
- Matsumi, H., T. Yano, Y. Osuga, K. Kugu, X. Tang, J. P. Xu, N. Yano, Y. Kurashima, T. Ogura, O. Tsutsumi, T. Koji, H. Esumi and Y. Taketani. 2000. Regulation of nitric oxide synthase to promote cytotaxis in ovarian follicular development. *Biol. Reprod.* 63:141~146.
- Pieterse, M. C., K. A. Kappen, T. A. M. Kruip and M. A. M. Taverne. 1998. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology* 30:751~762.
- Rexroad, C. E. Jr.. 1989. Co-culture of domestic animal embryos. *Theriogenology* 31:105~114.
- Sladex, S. M., R. R. Magness and K. P. Conrad. 1997. Nitric oxide and pregnancy. *Am. J. Physiol.* 272:441~463.
- Spicer, L. J., J. Klindt, F. C. Buonomo, R. Maurer, J. T. Yen and S. E. Echternkamp. 1992. Effect of porcine somatotropin on number of granulosa cell luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor, oocyte viability and concentrations of steroids and insulin-like growth factors I and II in follicular fluid of lean and obese gilts. *J. Anim. Sci.* 70:3149~3157.
- Webb, R., J. G. Gong and T. A. Bramley. 1994. Role of growth hormone and intracellular peptides in follicle development in cattle. *Theriogenology* 41:25~30.

Effects of growth hormone and hemoglobin supplementation on the developmental competence of bovine oocytes during *in vitro* maturation and culture ⁽¹⁾

Jenn-Rong Yang⁽²⁾, Jen-Wen Shiau⁽²⁾, Feng-Hsiang Chu⁽²⁾,
Perng-Chin Shen⁽²⁾ and Shan-Nan Lee^{(2) (3)}

Received : Mar. 28 , 2002 ; Accepted : Sep. 12, 2002

Abstract

This experiment was conducted to investigate the effects of growth hormone and hemoglobin supplementation on the developmental competence of bovine oocytes during *in vitro* maturation and culture, and efficiency promotion in bovine embryos in an *in vitro* production system.

The results show that the cleavage rates were 56.0 %, 55.1 % and 51.9 % when the maturation medium was supplemented with porcine growth hormone 0.01, 0.1 and 1 µg/ml, respectively. These rates were significantly higher than the control 43.3% ($P < 0.05$). The percentage of embryos developed to morula plus blastocyst were 16.7% and 15.2% when the culture medium was supplemented with bovine hemoglobin 0.01 and 0.1 µg/ml, respectively. These results were significantly higher than the control 12.1% ($P < 0.05$). However, the percentage of embryos developed to morula plus blastocyst when supplemented with hemoglobin 1 µg/ml was significantly lower than the control (8.2% vs. 12.1%) ($P < 0.05$). These results indicated that porcine growth hormone supplementation at 0.01, 0.1 and 1 µg/ml could improve the bovine oocyte cleavage rate during *in vitro* maturation. Supplementation of bovine hemoglobin 0.01 and 0.1 µg/ml could improve the developmental competence of bovine embryos during *in vitro* culture. This study provides optimal application for future bovine *in vitro* production systems.

Key words : Growth hormone, Hemoglobin, Bovine oocyte, *In vitro* development.

(1) Contribution No. 1136 from Taiwan Livestock Research Institute, Council of Agriculture.

(2) Dept. of Animal Physiology, COA-TLRI, HsinHua, Tainan, Taiwan, R.O.C.

(3) Corresponding author.