

卵母細胞取得方法與培養液成分對山羊胚體外發育之影響⁽¹⁾

林信宏⁽²⁾⁽³⁾ 黃政齊⁽⁴⁾ 康定傑⁽⁴⁾ 王得吉⁽⁵⁾ 郭廷雍⁽⁶⁾ 康獻仁⁽²⁾
 劉世賢⁽³⁾ 劉炳燦⁽⁷⁾ 彭劭于⁽⁷⁾ 沈朋志⁽⁷⁾⁽⁸⁾

收件日期：106 年 11 月 2 日；接受日期：107 年 1 月 15 日

摘 要

本試驗之目的在探討兩種山羊卵母細胞回收方法對所取得卵丘卵母細胞複合體 (cumulus-oocyte complexes, COCs) 品質之影響，以優化之山羊胚體外生產系統 (*in vitro* production, IVP)。結果顯示，以手術刀片切割卵巢濾泡方式取得之 COCs 品質為一與二級者之百分比顯著高於以注射針抽取者 (55.7% vs. 33.0%； $P < 0.05$)；進一步經體外成熟 (*in vitro* maturation, IVM) 培養後達成熟之百分比則均相近 (78.3% vs. 77.7%)。此外，若將手術刀片切割卵巢濾泡方式取得之卵母細胞經體外成熟及體外受精 (*in vitro* fertilization, IVF) 後，分別以合成輸卵管液 (synthetic oviduct fluid, SOF) 或卵丘細胞共培養 (co-culture) 方法進行體外培養 (*in vitro* culture, IVC) 時，發現受精後之卵裂率 (28.2% vs. 37.1%) 與囊胚發育率 (4.3% vs. 0.0%) 於兩者間均為相近，但 SOF 系統培養可突破山羊胚於體外培養時之阻滯期，而發育至囊胚階段。進一步評估於基礎成熟培養液中添加半胱胺 (cysteamine) 和上皮細胞生長因子 (epidermal growth factor, EGF)，對卵母細胞體外成熟及受精後發育之影響。結果顯示，成熟培養時，於基礎成熟培養液 (對照組) 中同時添加 cysteamine 與 EGF，較僅添加 EGF 組與對照組具有較高之囊胚率 (36.1% vs. 15.7% vs. 10.0%； $P < 0.05$)。綜合上述結果，在山羊胚之體外生產系統中，使用手術刀片切割法可回收較佳之 COCs；於成熟培養液中同時添加 cysteamine 與 EGF，則有助於卵母細胞之成熟率及體外受精後之囊胚發育率。

關鍵詞：山羊、卵母細胞取得方法、培養液、成熟率、胚發育能力。

緒 言

山羊胚之體外生產系統包括卵母細胞之體外成熟、體外受精、及胚體外培養。此系統之建立，除有助於探討哺乳動物卵母細胞成熟、受精及早期胚發育之機制外，亦可供為生物技術相關領域，如基因轉殖、核轉置、胚分割及冷凍保存等研究之試驗胚源 (Baldassare *et al.*, 2003)。胚體外生產系統研究的深入發展，除可獲得卵母細胞成熟、精卵受精及受精卵發育機制之知識外，另可為動物育種及治療人類生殖障礙提供了具體之研究方向。

卵母細胞品質是影響整個體外培養系統健全建立的首要因素。哺乳動物卵丘卵母細胞複合體之評級，常由外圍卵丘細胞之包被型態而定 (吳等, 1991; 吳, 1998)。顆粒性細胞 (granulosa cells) 與卵母細胞之接觸，係由卵細胞質突起 (cytoplasmic process) 維持，該突起穿過透明帶而與冠狀帶 (corona radiata) 或卵丘細胞聯繫，並在卵母細胞表面與周圍冠狀或卵丘細胞間形成間隙接合 (gap junction)，冠狀帶或卵丘細胞扮演卵母細胞養分及訊息傳遞之重要角色 (吳等, 1991)。許多研究均已直接或間接證明，卵丘細胞之存在攸關卵母細胞之培養成熟率 (吳等, 1991; Crister *et al.*, 1986; Xu *et al.*, 1986)。惟目前常使用自卵巢腔狀濾泡 (antral follicles) 採集卵母細胞之方法，乃大多利用注射針負壓抽取 (牛：李等, 1997; 綿羊：Papadopoulos *et al.*, 2005; 山羊：Jimenez-Macedo *et al.*, 2006) 以獲得卵丘卵母細胞複合體。此種採集方式往往影響卵丘細胞包被之層數與完整性，在胚體外發育能力研究中發現，牛卵

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2582 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所高雄種畜繁殖場。

(3) 國立屏東科技大學獸醫學系。

(4) 行政院農業委員會畜產試驗所恆春分所。

(5) 桃園市政府農業局。

(6) 行政院農業委員會畜產試驗所遺傳育種組。

(7) 國立屏東科技大學動物科學與畜產系。

(8) 通訊作者，E-mail：pcshen@mail.npust.edu.tw。

母細胞外之卵丘細胞包覆完整性與其體外受精培養後的卵裂率 (cleavage rate) 呈正相關 (Khurana and Niemann, 2000)。因此，如何獲得較佳品質之卵丘卵母細胞複合體之方法對胚後續發育能力之影響將更形重要。

近年來，牛羊卵母細胞經體外成熟培養後恢復減數分裂至 Metaphase II (M II) 之成熟率，雖已有長足之改善 (Younis *et al.*, 1991)，惟所產製之受精卵經體外培養後仍無滿意之囊胚率 (Rho *et al.*, 2001; Teotia *et al.*, 2001)；此顯示體外成熟培養系統在促使卵母細胞胞質成熟方面仍有改善的空間 (Eppig, 1996)，其影響因子主要包括所使用之成熟培養液成分及培養環境 (Cognie *et al.*, 2003)。哺乳動物胚於體外培養皆有發育受阻之可能性，即所謂之發育阻滯期 (block stage)。此乃因胚於發育初期，所需之營養來源，係由卵源性蛋白質或 mRNA 所供應，其後此營養供應模式將轉變由胚基因活化後其 mRNA 轉譯 (translation) 合成之產物所取代，此種營養供應模式之改變即為造成胚於體外培養時，呈現發育阻滯現象之原因 (Telford, 1990)。已知山羊胚於體外培養時之發育阻滯期發生在 8 – 16- 細胞期，此種限制目前已可由應用輸卵管上皮細胞之共培養而獲得解決 (Gandolfi and Moor, 1987)。其原因與進行共培養之體細胞可能具備產生未知之胚生長因子，或可去除源自胚所產生而釋入培養液之毒素有關 (Eyestone and First, 1986)。然而，就胚產製效率或基因表現正常性而言，源自體外生產者仍與體內生產者存在極大之差異 (Niemann and Wrenzycki, 2000)，這也說明胚之體外生產系統仍有改善之空間。因此，如何使卵母細胞之體外成熟培養及受精卵之體外培養條件均更接近於自然生理狀態，將是提高胚體外生產效率之重要關鍵。目前牛胚、綿羊胚與山羊胚所使用之體外培養系統大都以合成輸卵管液為主 (Takahashi and First, 1992)，尤其在牛胚方面更顯效果，而具備全球研究應用之趨勢。惟國內在有關山羊胚之體外培養系統之研究迄今較少被探討，本研究擬比較手術刀片切割與注射針筒吸取兩種不同卵丘卵母細胞複合體回收方式，對卵母細胞品質與經體外培養之成熟率及後續胚發育率之影響。進一步更探討不同培養液對源自體外成熟及體外受精之山羊胚發育至囊胚能力之影響。期藉由一系列試驗獲致較佳之卵母細胞取得方式、培養液成分與體外培養系統，供建立較完善之山羊胚體外生產技術。

材料與方法

I. 供卵山羊之超級排卵

供卵巢母山羊之超量排卵處理，係修正自 Gal (1996) 與 Baldassarre *et al.* (2003) 之方法，即將各試驗母羊先於陰道進行含 0.3 g progesterone CIDR[®] (controlled internal drug release, CIDR[®], EAZI-breed, Rydalmere, Australia) 埋植 11 日，埋植日為第 0 日，於第 11 日手術摘除卵巢後移除 CIDR[®]；於第 9 日上午起至 10 日連續 2 日每隔 12 h 各一次給予肌肉注射濾泡激素 (porcine follicle stimulating hormone, pFSH, Sigma-Aldrich F-2293, St. Louis, Mo, USA) 共注射 4 劑，其注射量依序為 4 mg, 4 mg, 2 mg, 2 mg 之遞減劑量合計 12 mg。並於注射第一劑 pFSH 後 48 h，將經上述處理之母羊即予以腹中線外科手術摘除卵巢。

II. 山羊卵母細胞之取得

(i) 卵巢保存液之配製

卵巢保存液之製備，係將 990 mL 之 DPBS (dulbecco's phosphate buffered saline; Invitrogen 21300-025) 溶液，添加 10 mL 之胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, Invitrogen 10270-106 Grand Island, NY, USA) 及 100 μ L 含 50 mg/mL 之 gentamicin 溶液 (Sigma-Aldrich G-1397) 配製而成，並經 0.22 μ m 之濾膜過濾 (Minisart[®], Sartorius, USA) 後分裝冷藏 (4°C) 備用。

(ii) 卵巢之取得與處理

上述超量排卵處理之試驗母山羊，於第一劑 pFSH 注射後之 48 h 摘取卵巢，試驗動物於試驗前禁食 1 日，以避免麻醉後胃中內容物逆流。每頭母羊於術前肌肉注射 0.2 mg/kg xylazine (Rompun[®], Bayer, Leverkusen, Germany) 與 0.025 mg/kg 硫酸阿托品 (atropine sulfate, Taiwan)，先行基礎鎮靜 10 min 後，續以靜脈注射 0.75 mg/kg 之舒泰 50[®] (Tiletamine base, 25 mg/mL and Zolazepam base, 25 mg/mL)，並視動物麻醉狀況斟酌給予補充麻醉劑，以利卵巢切除手術之進行，卵巢經切除後，予以保存於 37°C 卵巢保存液中。卵巢處理前先以 30°C 左右含 0.1 mg/mL penicillin-streptomycin (Invitrogen 15140-122) 之 0.9% 生理鹽水洗淨後，再噴灑 75% 之酒精，並重複三次以達充分之淨菌，其後再置於直徑 10 cm 之乾淨培養皿中，備供卵丘卵母細胞複合體取得使用。

(iii) 卵母細胞之取得與處理

1. 手術刀片切割法

將卵巢經由無菌手術刀片逐一破卵巢表面直徑約 2 – 6 mm 之濾泡，並以濾泡沖洗液沖出各濾泡之

內容物，包括卵丘卵母細胞複合體及其濾泡液。抽取獲得之濾泡內容物，置於低倍 (20× – 30×) 之解剖顯微鏡下，以適當口徑之玻璃吸管 (Pasteur pipette)，將懸浮於濾泡液內之卵丘卵母細胞複合體全數吸出，並於顯微鏡下選取不同卵丘細胞包被完整度及卵母細胞質均勻分布之卵丘卵母細胞複合體，經回溫 (37°C) 之成熟培養液清洗 3 – 5 次後，供體外成熟培養之用。

2. 注射針抽取法

將接有 18 號針頭之 1 mL 注射筒，吸取卵巢表面直徑約 2 – 6 mm 各濾泡之內容物，包括 COCs 及其濾泡液，濾泡直徑超過 8 mm 者應避免抽取；因其濾泡中含有高量之動情素、濾泡液較濃稠且易產生凝集現象，而增加卵母細胞收集之困難度。抽取獲得之濾泡內容物，置於低倍之立體解剖顯微鏡下，以適當口徑之玻璃吸管，將懸浮於濾泡液內之 COCs 回收，並選取不同卵丘細胞包被完整度及卵母細胞質均勻分布之 COCs，經回溫 (37°C) 之成熟培養液清洗 3 – 5 次後，供體外成熟培養之用。

3. 卵丘卵母細胞品質等級評級

收集之山羊 COCs，係依據 Shirazi *et al.* (2005) 所述之卵母細胞品質分級標準，一級：卵母細胞外圍有三層以上之完整卵丘細胞，且胞質分布均勻。二級：卵母細胞外圍有一至兩層之完整卵丘細胞。三級：卵母細胞部分裸露，無完整卵丘細胞包圍。四級：卵母細胞完全裸露。每一試驗組將一、二級與三、四級分開，並置入體外成熟培養液滴中，於 38.5°C、5% CO₂ 及飽和相對濕度條件下進行 24 h 體外培養。

(iv) 卵母細胞之體外成熟培養

1. 成熟培養液之配製

供山羊卵母細胞體外成熟之培養液，係修正自李等 (1997) 與 Cognie *et al.* (2003)，由 M-199 (Invitrogen 12340-030) 培養液，添加 10% 之 FBS、0.02 unit/mL pFSH、0.2 mM 丙酮酸鈉 (sodium pyruvate, Sigma-Aldrich P-3662)、1 µg/mL 雌性素 (estradiol-17β, E2, Sigma-Aldrich, E-8875) 及 5 ng/mL gentamicin (Sigma-Aldrich G-1397) 配製而成，並經 0.22 µm 之濾膜 (Minisart®) 過濾後分裝 (10 mL/管) 冷藏 (4°C) 備用。

2. 體外成熟培養

依據李等 (1997) 之牛卵體外成熟培養步驟，於進行培養前，先於 35 mm 之培養皿中製作 4 滴均含 80 µL 之培養液滴，並覆蓋礦油 (mineral oil, Sigma-Aldrich M-8410)，再置於 38.5°C、5% CO₂、95% 空氣及 100% 相對濕度條件之培養箱中，進行至少 4 h 之平衡。其後，再將前述所收集之山羊卵丘卵母細胞複合體，以 10 – 20 個之數量平均移入上述備妥之體外成熟培養液滴中，並於相同培養環境下，進行 24 h 體外成熟培養。上述所收集之山羊卵丘卵母細胞複合體經 24 h 之體外成熟培養後，以含 0.1% hyaluronidase (Sigma-Aldrich, H-3506) 之 DPBS 清洗液短暫地浸泡處理，接著利用適當口徑之玻璃吸管，以機械式連續吸吐方式完全移除其外圍包被之卵丘細胞，經體外成熟培養液清洗兩次後進行觀察。

III. 卵母細胞之體外受精

(i) 精子洗滌液之配製

係參考 Younis *et al.* (1991) 之方法，精子洗滌液配製乃取 90 mL 洗滌基礎液加入 10 mL 之山羊血清 (goat serum, Invitrogen 16210-064)，此洗滌液經充分混勻後，並經濾菌後冷藏 (4°C) 備用。

(ii) 精子獲能液之配製

精子獲能 (capaciation) 液配製是取 40 mL 精子洗滌液加入 40 µg caffeine (Sigma-Aldrich C-0750) 與 1,000 µg heparin (Sigma-Aldrich H-3149)，此獲能液經充分混勻後，並經濾菌後冷藏 (4°C) 備用。

(iii) 受精液之配製

取 5 mL 精子洗滌液加入 5 mL 精子獲能液，經充分混勻並經濾菌後冷藏 (4°C) 備用。

(iv) 體外受精之步驟

本試驗所使用之公山羊新鮮精液，係應用人工陰道 (artificial vagina) 所收集者。山羊精子之體外獲能方法係修正自 Younis *et al.* (1991)、Izquierdo *et al.* (2002) 與 Cognie *et al.* (2003) 之方法，加入 4 倍量 38.5°C 精子洗滌液於新鮮山羊精液中輕搖晃進行稀釋，隨即置入 38.5°C、5% CO₂ 及 100% 相對濕度條件之培養箱中進行培養 1 h。接著取出上層約 1 mL 之精子稀釋液，加入 1 mL 室溫精子洗滌液，經用吸管輕柔洗滌後，以 200 × g 離心 10 min，然後去除上層液保留 1 mL 與前述洗滌液 1 mL 混合，進行第二次洗滌，再以 200 × g 離心 10 min，然後去除上層液保留 1 mL 與精子獲能液 1 mL 混合，隨即置入 38.5°C、5% CO₂ 及 100% 濕度條件之培養箱中進行獲能 15 min。經檢查精子活力並計算濃度，將精子濃度調整至含有 1 × 10⁷ 精子/mL，製作 100 µL 含上述精子濃度之小滴，上層覆蓋約 2 mL 之礦物油，置於 38.5°C、5% CO₂ 及 100% 濕度條件之培養箱中。

上述所收集之山羊 COCs 經 24 h 之體外成熟培養後，以含 0.1% hyaluronidase 之 DPBS 清洗液短暫地浸

泡處理，接著利用適當口徑之玻璃吸管，以機械式連續吸吐方式約略移除其外圍包被之卵丘細胞，經體外成熟培養液清洗兩次，再以受精液清洗 3 次，再將 10 至 20 個卵母細胞置入已獲能作用之精液小滴內，並移入恆溫培養箱中進行 24 h 之體外受精。

IV. 受精卵之體外培養

(i) 合成輸卵管液之配製

係依據 Takahashi and First (1992) 之 SOF 配方配製。此液經充分混勻及濾菌後冷藏 (4°C) 備用。

(ii) 卵丘細胞飼養層液滴之製備

係參考自宋 (1998) 之方法，將前述山羊卵體外成熟培養內含卵丘卵母細胞複合體之培養液滴，於體外成熟培養終了經移去卵母細胞後，再置回培養箱內繼續培養，殘留卵丘細胞將繼續生長並平貼於培養皿表面，而形成卵丘細胞單層飼養層 (monolayer)，遂可提供山羊胚在體外進行共培養時之使用。在進行山羊胚與卵丘細胞飼養層共培養之前，先利用玻璃吸管吸除未平貼於培養皿底部而懸浮之卵丘細胞，同時並於受精卵移入前再置換約 1/2 體積量之體外胚培養液。

(iii) 體外培養之步驟

卵母細胞經 24 h 之體外受精培養後，利用微玻管吸取至胚培養液中，以機械式連續吸吐移除包被外圍之精子，並經胚培養液清洗 3 次後，再將該卵母細胞分別放置於 SOF 或卵丘細胞共培養之體外培養系統中進行培養。SOF 體外培養系統係依據 Jimenez-Macedo *et al.* (2006) 之山羊胚體外培養步驟，於進行培養前，事先於 35 mm 之培養皿中製作 4 滴均含 25 μ L 之 SOF 培養液滴，並覆蓋礦物油，再置於 38.5°C、5% CO₂、5% O₂、90% N₂ 及 100% 相對濕度條件之培養箱中，進行至少 4 h 之平衡。其後，再將前述受精卵經 SOF 培養液清洗 3 次後，以 10 – 20 個數量移入上述備妥之體外培養液滴中。體外培養 48 h 後觀察卵裂情形，並分別添加 2.5 μ L FBS 至液滴中。於體外培養期間，每 24 h 持續觀察記錄胚發育狀況。另外，卵丘細胞共培養係以前述經成熟培養液清洗後之受精卵，將其移入原已培育形成單層卵丘細胞之卵丘細胞飼養層培養液中，進行共培養 (李等, 1997)。體外培養 48 h 後觀察卵裂情形，並於體外培養期間，每 24 h 持續觀察記錄胚發育狀況。

V. 試驗設計

試驗一：不同取得方法對山羊卵丘卵母細胞複合體品質與體外成熟率之影響

本試驗之卵巢來源為利用 pFSH 超量排卵處理之母山羊。以外科手術方法取得之卵巢被隨機分成二組，分別以無菌手術刀片逐一切破卵巢表面直徑約 2 – 6 mm 之濾泡，並沖洗收集濾泡內容物，或以接有 18 號針頭之 1 mL 注射筒，經由負壓逐一吸取卵巢表面直徑約 2 – 6 mm 各濾泡之內容物，分別評估兩組取得卵丘卵母細胞複合體之卵丘細胞包被完整性，並進行卵母細胞評級。接著於 38.5°C、5% CO₂ 及 100% 相對濕度 (飽和濕度) 之條件下分別培養於體外成熟培養液中，進行 24 h 之體外成熟培養。經成熟培養後，完全去除卵丘細胞，以評估各組卵母細胞經體外成熟培養後達 M II 之百分比。

試驗二：培養系統對體外成熟受精後山羊胚發育率之影響

外科手術方法取得經 pFSH 超量排卵處理之卵巢後，以無菌手術刀片取得卵丘卵母細胞複合體，並予以進行 24 h 之體外成熟培養。續予以進行 24 h 之體外受精。其後，將受精卵隨機分成二組，分別置入 SOF 胚培養液滴中，於 38.5°C、5% CO₂、5% O₂ 及 90% N₂ 及 100% 相對濕度條件之培養箱中，或具卵丘細胞層培養液中，於 38.5°C、5% CO₂ 及飽和濕度條件之培養箱中進行 8 日之體外培養。於開始培養後，每日 (24 h) 記錄該等山羊胚之發育情形。用以評估山羊受精卵於不同體外培養系統下發育能力之差異。

試驗三：成熟培養液中添加半胱胺與上皮細胞生長因子對山羊卵母細胞體外發育能力之影響

本試驗之卵巢源自利用 pFSH 超量排卵處理之母山羊。以外科手術方法取得卵巢後，分別以無菌手術刀片逐一切割卵巢表面直徑約 2 – 6 mm 之濾泡並沖洗收集濾泡內容物，收集一級及二級之山羊卵丘卵母細胞複合體 (COCs)，並隨機分配至於成熟培養液中添加 100 μ M cysteamine (試驗處理一)、10 ng/mL EGF (試驗處理二) 或兩者皆添加 (試驗處理三) 之各試驗處理組，並以原成熟培養液為對照組 (試驗處理四)。接著於 38.5°C、5% CO₂ 及 100% 相對濕度之條件下分別培養於體外成熟培養液中，進行 24 h 之體外成熟培養。續利用新鮮精液於體外獲能後予以進行 24 h 之體外受精。經體外受精後分別置入 SOF 胚培養液滴中，於 38.5°C、5% CO₂、5% O₂ 及 90% N₂ 及 100% 相對濕度條件之培養箱中進行 8 天之體外培養。於開始培養後每 24 h 記錄該等山羊胚之發育情形。用以評估山羊體外成熟培養液中添加 cysteamine 與 EGF 後之受精卵發育能力差異。

VI. 統計分析

本研究之各試驗中，各處理組之山羊卵母細胞經體外成熟培養後之成熟率計算，係以發育至 M II 期之卵

數除以該組供成熟培養之總卵數；而其胚發育率之計算，則以分裂至各胚期之胚數除以該組供培養之總胚數。各值於處理組別間之差異，均以卡方分析法 (Chi-square analysis) 分析之，並使用統計分析系統 (SAS Institute, 2005) 之套裝軟體執行該分析工作。

結果與討論

羊胚之體外生產系統雖已發展多年，但整體之囊胚率仍低於體內發育者 (Rho *et al.*, 2001; Teotia *et al.*, 2001)，說明胚體外生產系統仍有改善空間。然而影響胚體外生產效率之因子甚多，其中在卵母細胞體外培養階段，主要關鍵乃在卵母細胞的細胞核與細胞質成熟與否，目前核成熟之判定已可由卵母細胞是否發育至 M II 期而定 (Younis *et al.*, 1991)，但細胞質成熟與否則較難有一明確指標可判定 (Eppig, 1996)，惟攸關卵母細胞體外成熟培養之因子，主要包括所使用之卵母細胞來源、取得方式 (Shirazi *et al.*, 2005)、卵丘細胞之包覆完整性 (吳等, 1991b; Crister *et al.*, 1986; Xu *et al.*, 1986)、成熟培養液成分 (Cognie *et al.*, 2003) 等。許多研究均已證明，卵母細胞外所包覆之卵丘細胞完整性攸關卵母細胞之體外成熟率 (吳等, 1991b; Crister *et al.*, 1986; Xu *et al.*, 1986)，且證實卵丘細胞之包覆完整性與卵母細胞成熟率呈正相關 (宋, 1998; Nandi *et al.*, 1998)。試驗一，分別以手術刀片切破與注射針抽吸兩種方法收集山羊卵丘卵母細胞複合體，結果顯示以手術刀片切割法所收集卵丘卵母細胞複合體品質為一與二級者之百分比顯著高於利用注射針抽取者 (55.7% vs. 33.0%) ($P < 0.05$)，品質為三與四級者之數目百分比則顯著低於利用注射針抽取者 (44.2% vs. 66.9%) ($P < 0.05$) (表 1)。此與 Shirazi *et al.* (2005) 在綿羊的研究結果相似。在馬 (Choi *et al.*, 1993)、牛 (Carolan *et al.*, 1994)、水牛 (Das *et al.*, 1996) 等物種之研究亦顯示，手術刀片切割法可取得較佳品質之卵丘卵母細胞。此乃可能因利用注射針抽取法容易因負壓而造成卵丘細胞脫落所致 (Choi *et al.*, 1993; Carolan *et al.*, 1994; Das *et al.*, 2000; Shirazi *et al.*, 2005)。此外，本研究中也發現，不論使用手術刀切割或注射針抽取方法所收集之一與二級山羊卵丘 COCs (78.3% 與 77.7%)，進一步經體外培養後達成熟之百分比均顯著高於三與四級者 (46.7% and 53.4%) (表 1)。類似之結果亦見於豬 (吳等, 1991)、山羊 (林, 1990)、綿羊 (Staigmiller and Moor, 1984) 與牛 (Dahlhausen *et al.*, 1981) 等動物之研究。這說明卵母細胞外之卵丘細胞包覆不足不利於卵母細胞之成熟與發育，此可能導因於卵母細胞之成熟乃經由其外圍所包覆之卵丘細胞與卵母細胞表面形成的間隙接合，提供養分及訊息傳遞之作用 (吳等, 1991)。因此，在卵丘細胞包覆不完整條件下，卵母細胞將無法獲得足夠之養分及較差之訊息傳導，因而導致其成熟率下降。

表 1. 卵母細胞收集方法對山羊卵丘卵母細胞複合體品質及體外成熟率之影響

Table 1. Effects of collection methods on the integrity of the cumulus-cell complex and *in vitro* maturation rates of caprine oocytes

Collection method	Total of oocytes	Oocytes grade	No. (%) of oocytes	No. (%) of oocytes developed to M II
Ovary/follicle slicing	174	I ¹ and II ²	97 (55.7) ^a	76 (78.3) ^a
		III ³ and IV ⁴	77 (44.2) ^b	36 (46.7) ^b
Follicle aspiration	109	I and II	36 (33.0) ^b	28 (77.7) ^a
		III and IV	73 (66.9) ^a	39 (53.4) ^b

^{a, b} Values without same superscripts in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

¹ Oocytes with evenly granulated cytoplasm surrounded more than three layers of cumulus cells (Grade I).

² Oocytes surrounded with one or two layers of cumulus (Grade II).

³ Partially denuded oocytes (Grade III).

⁴ Completely denuded oocytes (Grade IV).

前人研究顯示，山羊胚與輸卵管上皮細胞共培養可突破其發育阻滯期 (Gandolfi and Moor, 1987)，而牛胚利用卵丘細胞共培養 (李等, 1997) 或使用 SOF (Takahashi and First, 1992) 之半確定 (semi-defined) 培養液皆具有較佳之發育率，因此說明胚的體外培養系統確實影響其發育能力。因此於試驗二中探討不同體外培養系統對山羊胚發育能力影響之結果雖顯示，利用 SOF 或卵丘細胞共培養系統之成熟率 (69.5% vs. 77.1%)、卵裂率 (28.2% vs. 37.1%) 或囊胚發育率 (4.3% vs. 0.0%) 間均相近 ($P > 0.05$) (表 2)，但其中僅有使用 SOF 培養系統者能使受精卵突破體外培養之發育阻滯期而發育至囊胚期。在 Rodriguez-Dorta *et al.* (2007) 亦發現，山羊受精卵利用 SOF 培養系統較之與輸卵管上皮細胞共培養系統者有較佳之囊胚發育率 (23% vs. 16%)。學者認為 SOF 培養系統因具有可精確得知胚代謝與營養

需求及對胚發育環境重現性高之優點；反之，共培養系統則可能存在共培養體細胞與液體間的交互作用而無法精確提供胚發育所需成分與環境 (邱, 2003; Bavister, 1995)，因此建議可應用 SOF 為基礎培養液釐清胚培養液成分之改變對胚發育能力之影響，此也是近年來多數研究者採用 SOF 培養系統 (山羊: Rodriguez-Dorta *et al.*, 2007; 牛: Hakan *et al.*, 2007; 綿羊: Garcia-garcia *et al.*, 2007) 之原因。

綜合上述試驗雖已確立了卵丘卵母細胞複合體之收集方法 (試驗一) 與胚體外培養系統 (試驗二)，然而試驗二所得之囊胚發育率仍低，因此仍有改善之需要。已知動物體組織中除呼吸系統之組織具有與環境相近之 20% 高氧分壓，其他組織則處於 5 – 8% 之低氧分壓條件；而目前培養箱之氧分壓與環境相近為 20%，而 SOF 培養系統之氧分壓條件為 5%。因此，於本研究中在使用 SOF 培養系統條件下，卵母細胞成熟培養迄胚培養期間，IVM 階段仍處於高氧分壓狀態。是以，於本研究之試驗三即探討於 IVM 階段中添加抗氧化劑對山羊胚發育能力之影響。此外，亦有報告指出，於成熟培養液中添加 EGF 確有助於山羊胚之體外發育能力 (Cognie *et al.*, 2003; Rodriguez-Dorta *et al.*, 2007)，因此於本試驗中亦一併評估。就試驗三之結果顯示，第 9 天之山羊胚囊胚率均以成熟培養液中 cysteamine 及 EGF 兩者皆添加者最高 (36.1%)，且顯著高於僅添加 EGF 組 (15.7%) 及未添加之對照組 (10.0%)，但與僅添加 cysteamine 組 (25.0%) 間無顯著差異。此結果說明，於卵母細胞體外成熟培養期間抗氧化劑之添加確實可提升山羊胚之囊胚率。在其他動物別之研究也證實，IVM 培養液中添加抗氧化物 GSH，可顯著改善牛 (De Matos and Furnus, 2000)、水牛 (Gasparrini *et al.*, 2000)、豬 (Grupen *et al.*, 1995) 及綿羊 (De Matos *et al.*, 2002) 卵母細胞受精後之發育能力。而在 Cognie *et al.* (2003) 之研究更發現，於成熟培養液中同時添加 cysteamine 與 EGF，可將山羊胚之囊胚率自 8% 提昇至 53%。此也是本試驗中同時添加 cysteamine 與 EGF 具有較高囊胚率之理由。

綜合本研究之各試驗結果說明，以手術刀片切割法收集山羊卵丘卵母細胞複合體可增加高品質卵母細胞之回收。於 SOF 培養系統，可突破山羊胚於體外培養時之發育阻滯期，而發育至囊胚期。此外，於成熟培養液中同時添加 cysteamine 與 EGF 可提高山羊胚之囊胚率。

表 2. 體外培養系統對山羊卵母細胞發育能力之影響

Table 2. Effects of *in vitro* culture systems on the developmental potential of caprine oocytes

Culture system	Total of oocytes	No. (%) of M II	No. (%) of cleavage	No. of blastocyst (% of total oocytes)
SOF	46	32 (69.5)	13 (28.2)	2 (4.3)
Cumulus cell co-culture	35	27 (77.1)	13 (37.1)	0 (0.0)

表 3. 添加半胱胺與上皮生長因子於成熟培養液中對山羊卵母細胞體外受精後發育能力之影響

Table 3. Effects of cysteamine and EGF supplementation in IVM medium on the post-fertilization cleavage and development of the caprine oocytes

Maturation conditional medium	Total of oocyte	No. (%) of cleavage ^{c,2}	No. of blastocyst (% of total oocytes)			
			6 dpi ¹	7 dpi	8 dpi	9 dpi
Control ²	30	19 (63.3)	0 (0.0)	0 (0.0) ^b	3 (10.0)	3 (10.0) ^b
Cysteamine	32	22 (68.7)	1 (3.1)	4 (12.5) ^a	7 (21.8)	8 (25.0) ^{ab}
EGF	38	24 (63.1)	0 (0.0)	3 (7.8) ^{ab}	5 (13.1)	6 (15.7) ^b
Cysteamine and EGF	36	22 (61.1)	2 (5.5)	7 (19.4) ^a	10 (27.7)	13 (36.1) ^a

^{a, b} Values without same superscripts in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

¹ dpi: Day post IVF.

² M199 supplemented with E2, FBS, pFSH, sodium pyuvate and gentamicin.

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(4): 429-438。
- 宋麗英。1998。牛胚體外生產技術之開發及其在基因轉殖研究之應用。碩士論文。國立臺灣大學，臺北。
- 吳信志。1998。豬乳鐵蛋白及 (或) 人類凝血第九因子基因轉殖小鼠及基因轉殖豬之產製與分析。博士論文。國立

臺灣大學，臺北。

- 吳信志、鄭三寶、劉炳燦、邱啟明、朱志成。1991。豬卵母細胞體外成熟及受精後之發育能力：II. 卵巢濾泡之大小和添加濾泡液於成熟培養液之影響。中畜會誌 20：469-480。
- 邱詮文。2003。牛胚之體外生產。碩士論文。國立屏東科技大學，屏東。
- 林佳靜。1990。山羊卵母細胞之體外成熟與體外受精。碩士論文。國立臺灣大學，臺北。
- Baldassare, H., B. Wang, N. Kafidi, M. Gauthier, N. Neveu, J. Lapointe, L. Sneek, M. Leduc, F. Duguay, J. F. Zhou, A. Lazaris and C. N. Karatzas. 2003. Production of transgenic gaats by pronuclear microinjection of *in vitro* produced zygotes derived from oocytes recovered by laparoscopy. *Theriogenology* 59: 831-839.
- Bavister, B. D. 1995. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum. Reprod. Update* 1: 91-148.
- Carolan, C., P. Monaghan, M. Gallagher and I. Gordon. 1994. Effect of recovery method on yield of bovine oocytes per ovary and their developmental competence after maturation, fertilization and culture *in vitro*. *Theriogenology* 41: 1061-1068.
- Choi, Y. H., S. Hochi, J. Braun, K. Sato and N. Oguri. 1993. *In vitro* maturation of equine oocytes collection by follicle aspiration and by the silicing of ovaries. *Theriogenology* 40: 959-966.
- Cognie, Y., G. Baril, N. Poulin and P. Mermillod. 2003. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology* 59: 171-188.
- Crister, E. S., M. L. Leibried- Rutledge, W. H. Eyestone, D. L. Northey and N. L. First. 1986. Acquisition of developmental competence during maturation *in vitro*. *Theriogenology* 25: 150 (Abstr.)
- Dahlhausen, R. E., J. B. Bonham and G. Ludwick. 1981. Characterization and maturation of prepuberal calf follicular oocytes *in vitro*. *Theriogenology* 15: 111. (Abstr.)
- Das, G. K., G. C. Jain, V. S. Solanki and V. N. Tripathi. 1996. Efficacy of various collection methods for oocyte retrieval in buffalo. *Theriogenology* 46: 1403-1411.
- De Matos, D and C. Furnus. 2000. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine *in vitro* maturation on embryo development, effect of β -mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology* 53: 761-771.
- De Matos, D., B. Gasparini, S. R. Pasqualini and J. G. Thompson. 2002. Effect of glutathione synthesis stimulation during *in vitro* maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. *Theriogenology* 57: 1443-1451.
- Eppig, J. J. 1996. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reprod. Fertil. Dev.* 8: 485-489.
- 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.)
- Gal, F. 1996. *In vitro* maturation and fertilization of goat oocytes frozen at the germinal vesicle stage. *Theriogenology* 45: 1177-1185.
- Gandolfi, F. and R. M. Moor. 1987. Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J. Reprod. Fertil.* 81: 23-28.
- Garica-Garica, R. M., F. Ward, S. Fair, C. M. Omeara, M. Wade, P. Dufft and P. Longergan. 2007. Development and quality of sheep embryos cultured in commercial G 1.3/G 2.3 sequential media. *Anim. Reprod. Sci.* 98: 233-240.
- Gasparini, D., G. Neglia, R. Di. Palo, G. Campanile and L. Zicarelli. 2000. Effect of cysteamine during IVM on buffalo embryo development. *Theriogenology* 54: 1537-1542.
- Gruppen, C., H. Nagashima and M. Nottle. 1995. Cysteamine enhances *in vitro* development of porcine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Biol. Reprod.* 53:173-178.
- Hankan, S., M. Misirlioglu, A. Kaya, N. L. First, J. J. Parrish and E. Memili. 2007. Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. *Anim. Reprod. Sci.* 101: 225-240.
- Izquierdo, D., P. Villamediana, M. Lopez-Bejar and M. T. Paramio. 2002. Effect of *in vitro* and *in vivo* culture on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes. *Theriogenology* 57: 1431-1441.
- Jimenez-Macedo, A. R., D. Izquierdo, A. Urdeneta, B. Anguita and M. T. Paramio. 2006. Effect of roscovitine on nuclear maturation, MPF and MAP kinase activity and embryo development of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* 65: 1769-1782.
- Khurana, N. K. and H. Niemann. 2000. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy

- substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. *Theriogenology* 54: 741-756.
- Nandi, S., M. S. Chauhan and P. Palta. 1998. Influence of cumulus cells and sperm concentration on cleavage rate and subsequent embryonic development of buffalo oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology* 50: 1251-1262.
- Niemann, H. and C. Wrenzycki. 2000. Alterations of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by *in vitro* culture conditions: implications for subsequent development. *Theriogenology* 53: 21-34.
- Papadopoulos, S., J. P. Hanrahan, A. Donovan, P. Duffy, M. P. Bland and P. Lonergan. 2005. *In vitro* fertilization as a predictor of fertility from cervical insemination of sheep. *Theriogenology* 63: 150-159.
- Rho, G. J., A. C. Hahnel and K. J. Betteridge. 2001. Comparisons of oocyte maturation times and of three methods of sperm preparation for their effects on the production of goat embryos *in vitro*. *Theriogenology* 56: 503-516.
- Rodriguez-Dorta, N., Y. Cognie, F. Gonzalez, N. Poulin, F. Guignot, J. L. Touze, G. Baril, F. Cabrera, D. Alamo, M. Batista, A. Gracia and P. Mermillod. 2007. Effect of coculture with oviduct epithelial cells on viability after transfer of vitrified *in vitro* produced goat embryos. *Theriogenology* 68: 908-913.
- SAS Institute. 2005. SAS/STAT Guide for Personal Computers. 9.1th ed. SAS Institute Inc., Cary, NC. U.S.A.
- Shirazi, A., N. Shams-Esfandabadi and S. M. Hosseini. 2005. A comparison of two recovery methods of ovine oocytes for *in vitro* maturation. *Small Ruminant Res.* 58: 283-286.
- Takahashi, Y. and First, N. L. 1992. *In vitro* development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino-acids and vitamins. *Theriogenology* 37: 963-978.
- Telford, N. A., A. J. Watsor and G. A. Schultz. 1990. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development : a comparison of several species. *Mol. Reprod. Dev.* 26: 90-100.
- Teotia, A., G. T. Sharma and A. C. Majumdar. 2001. Fertilization and development of caprine oocytes matured over granulose cell monolayers. *Small Ruminant Res.* 40: 165-177.
- Xu, K. P., T. Greve, S. Smith and P. Hytten. 1986. Chronological changes of bovine follicular oocyte maturation *in vitro*. *Acta. Vet. Scand.* 27: 505-519.
- Younis, A. I., K. A. Zuelke, K. M. Happer, M. A. Oliveira and B. G. Brackett. 1991. *In vitro* fertilization of goat oocytes. *Biol. Reprod.* 44: 1177-1182.

Effects of oocyte recovery methods and culture media on the development of *in vitro* produced caprine embryos ⁽¹⁾

Hsin-Hung Lin ⁽²⁾⁽³⁾ Jang-Chi Huang ⁽⁴⁾ Ting-Chieh Kang ⁽⁴⁾ De-Chi Wang ⁽⁵⁾
Ting-Yung Kuo ⁽⁶⁾ Shann-Ren Kang ⁽²⁾ Shyh-Shyan Liu ⁽³⁾ Bing-Tsan Liu ⁽⁷⁾
Shao-Yu Peng ⁽⁷⁾ and Perng-Chih Shen ⁽⁷⁾⁽⁸⁾

Received: Nov. 2, 2017; Accepted: Jan. 15, 2018

Abstract

The aim of this study was to establish some strategies for more effective *in vitro* goat embryo production. The result of slicing method could obtain significantly more cumulus-oocyte complexes (COCs) in good quality compared to aspiration method (55.7% vs. 33.0%) ($P < 0.05$), but there was no significant difference in the oocytes developed to M II stage after IVM in two methods (78.3% vs. 77.7%). In the COCs collected with slicing method and by IVM-IVF and subsequently cultured in the synthetic oviduct fluid solution (SOF) medium or co-culture medium with cumulus cell dividedly, both of the cleavage rates (28.2% vs. 37.1%) and blastocyst rates (4.3% vs. 0.0%) were similar. However, only the COCs cultured in SOF medium had the chance to break out of the block stage and developing to blastocyst stage. In addition, the effects of the supplements of cysteamine and/or epidermal growth factor (EGF) into the usual IVM medium (control) on the development rate of *in vitro* culture (IVC) after IVM-IVF have valuated. Results showed that the blastocyst rate of the IVM medium in the supplement of cysteamine combined with EGF was significant higher than the other two groups (36.1% vs. 15.7% and 10.0%). In conclusion, the COCs collected using slicing method from goats, and the supplement of cysteamine combined with EGF in the medium could obtain more high quality matured oocytes. Furthermore, it had the advantage of higher blastocyst production rate of the matured oocytes *in vitro* fertilized, and subsequently cultured in the SOF medium.

Key words: Goat, Oocytes collection method, Culture medium, Maturation rate, Embryo development ability.

(1) Contribution No. 2582 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Kaohsiung Animal Propagation Station, COA-LRI, Pingtung 91247, Taiwan, R. O. C.

(3) Department of Veterinary Medicine, National Pingtung University of Science and Technology. Pingtung 91201, Taiwan, R. O. C.

(4) Hengchun Branch, COA-LRI, Pingtung 94644, Taiwan, R. O. C.

(5) Department of Agriculture, Taoyuan City Government.

(6) Breeding and Genetics Division, COA-LRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(7) Department of Animal Science, National Pingtung University of Science and Technology. Pingtung 91201, Taiwan, R. O. C.

(8) Corresponding author, E-mail: pcshen@mail.npust.edu.tw.