

精液品质与其在体内、体外受精能力相关性的研究

马红, 王文涛, 付博, 何鑫森, 吴赛辉, 李忠秋, 汪亮, 彭福刚, 刘娣

(黑龙江省农业科学院畜牧研究所, 哈尔滨, 150086)

摘要: 本实验研究了公猪精液的精子密度、活率和畸形率等精液品质指标与其在自然交配、人工输精和体外受精中受精能力之间的关系。研究表明, 现有的精液品质评价参数可以反映该公猪在自然交配或人工输精后对体内卵母细胞的受精能力, 但相似品质的精液在体外受精能力上差异显著 ($p < 0.05$), 现有的精液质量评价参数不能反映其体外受精能力。**关键词:** 猪, 精液品质, 自然交配, 人工输精, 体外受精

Relationships among porcine Semen quality

and Fertility in vitro and in vivo

Ma Hong, Wang Wen-tao, Fu Bo, Wu Sai-hui, Li Zhong-qiu, Wang Liang, Peng Fu-gang, Liu Di
(Animal Husbandry Research Institute Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, 150086)

Abstract: This experiment compared the relationship among porcine sperm density, Survival rate, deformity rate and fertilization ability in natural mating, artificial insemination and in vitro fertilization. Studies show that the parameters of semen quality can reflect the fertilization ability in natural mating or artificial insemination, but they can't reflect the fertilization ability in vitro fertilization. Similarity parameters of semen quality had significant different in vitro fertilization ability ($p < 0.05$).

Key words: porcine; semen quality; natural mating; artificial insemination; in vitro fertilization

随着我国养猪业的发展, 对生猪良种的需求越来越大, 在如何充分利用现有的优秀种公猪资源, 加快杂交改良步伐方面, 已有很多尝试, 其中人工授精技术是目前应用最为广泛的技术手段^[1]。另外, 体外受精技术因其在基础理论研究和在生产应用上的潜力, 也被越来越广泛地研究。人工授精技术和体外受精技术两者在应用过程中, 都要求种公猪的精液有较好的受精能力。目前, 判断精液品质的主要参考指标包括精子密度、活率、畸形率等, 在研究和实践中, 这些指标在指导人工授精方面起了重要作用^[2], 但它们是否也适合指导体外受精目前并不清楚。本研究主要针对这一问题, 研究了相同公猪的精液在体内、体外受精能力的差异, 以及精液品质检测结果与体内、体外受精能力之间的一致性。通过本研究将为进一步充分利用优秀公猪遗传资源提高养猪业发展水平提供理论依据。

1 实验材料及方法

1.1 实验材料

自然受精和人工授精实验用猪为黑龙江省农业科学院畜牧研究所养猪场饲养种猪; 屠宰场收集的屠宰母猪卵巢, 置于 37℃ 左右的 0.9% 生理盐水中 4 h 内运回实验室备用; 人工采集黑龙江省农业科学院畜牧研究所养猪场的大白猪新鲜精液, 经稀释分装后在 16~18℃ 存放备用。

1.2 主要试剂

精液稀释液 (体外受精); 咖啡因 (caffeine), Fluka; 胎牛血清 (FCS) 购自 Hyclone 公司; 其他化学药品如无特殊说明, 均购自 Sigma。

精液稀释液（人工采精稀释）：临用前按商品化稀释液说明书要求配制，并添加青链霉素各 100 万 IU/L，充分混合。

卵母细胞清洗液：HEPES 缓冲中添加 0.1 % 聚乙烯醇(PVA) 的台氏液；

卵母细胞体外成熟(IVM)液：M199-Hepes 添加 10%体积比猪卵泡液(PFF), 0.57 mmol/L 半胱氨酸, 10 ng/mL 表皮生长因子(EGF), 10 IU/mL 人绒毛膜促性腺激素(hCG) 和 10 IU/mL 孕马血清促性腺激素(PMSG)；

体外受精液(mTBM液)：取适量 Milli-Q 水加入 0.661 g NaCl, 0.022 g KCl, 0.198 g Glucose, 0.242 g Tris, 0.055 g Sodium pyruvate, 0.1 g CaCl₂·2H₂O, Milli-Q 水定容至 100 mL, 0.20μm 滤器过滤后分装，于 4℃ 保存备用。使用前加入 0.194 g Caffeine, 0.100 g BSA。

胚胎培养液(NCSU-23)：取适量 Milli-Q 水，再按顺序加入 0.6355 g NaCl, 0.2106 g NaHCO₃, 0.0356 g KCl, 0.0162 g KH₂PO₄, 0.0162 g Glucose, 0.0146 g Glutamine, 0.0875 g Taurine, 0.0545 g Hypotaurine, 0.0293 g MgSO₄·7H₂O, 0.0249 g CaCl₂·2H₂O。用 Milli-Q 水定容至 100 mL, 调渗透压为 280~290mOsm, 0.22μm 微孔滤膜过滤, 4℃ 存放, 4 周内用完。

2 实验方法

2.1 自然交配

把适时发情母猪赶进配种栏，用指定的同一头公猪采用重复配种方式与其配种，两次交配相隔 12 h，配种后观察母猪怀孕情况，并记录产仔率。

2.2 种公猪精液采集、稀释及保存

选择可采精种公猪，诱导其爬上采精架，使其射精，收集精液于包有 4 层纱布的过滤集精瓶中，弃去最初射出的部分，采集乳白色的精液带回实验室。初步检查精液，将符合要求的精液进行稀释。

精液稀释时，将稀释液沿盛精液的杯壁缓慢加入到精液中，然后轻轻摇动或用消毒玻璃棒搅拌，使之混合均匀，使精液稀释至每个输精剂量含 40×10^9 个精子，进行分装、标记。稀释后精液置于 17℃ 恒温箱中平放保存，3 天内使用。

2.3 精液品质检测

2.3.1 精子密度和活率的检测

取未稀释的精液 1 uL 加入 1 mL 稀释液中，滴加在血球计数板上，统计精子总数、呈直线运动的精子数。计算精子密度和活率（图 1）。

2.3.2 精子畸形率检测

取 50 uL 精液滴于载玻片的一端，并用盖玻片把精液推成均匀的抹片。吉姆萨溶液染色 2~3 min，用水冲洗。干燥后，显微镜下计数 300~500 个精子，计算畸形精子百分率。

2.4 人工授精

得到母猪开始发情的报告后，取已稀释保存的精液，根据母猪发情开始时间和持续时间在一个发情期内输精 3 次。分别记录统计人工输精母猪的产仔率。

2.5 猪卵母细胞体外受精

2.5.1 卵母细胞体外成熟

将屠宰场收集的屠宰母猪卵巢，置于 37℃ 左右的 0. %生理盐水中 4 h 内运回实验室，生理盐水冲洗 3 次。用带有 18 号针头的注射器抽取卵巢表面直径 2~6 mm 卵泡的卵母细胞，

体视显微镜下挑选带 2 层以上卵丘细胞且胞质均匀的卵丘卵母细胞复合体 (COCs)，在清洗液中洗 3 次后再在成熟液中清洗 3 次，移入含有激素的成熟液中成熟 22 h，转入无激素培养液中成熟培养至 44 h (图 2)。

2.5.2 卵母细胞准备

将在体外成熟培养 44 h 的 COCs，根据实验需要保留或去除颗粒细胞，用预先平衡的受精液清洗 3 次，移入平衡好的 50 μ L 受精液滴中，每滴 20 枚，备用。

2.5.3 精子准备

根据精子密度取适量鲜精液，导入装有 1.0 mL 清洗液的 1.5 mL EP 管中，用移液器轻轻混匀，10000 rpm/min 瞬时离心。离心后去掉上层清液，留底部 0.2 mL 液体，再加入 0.8 mL 清洗液，再离心，重复清洗 3 次后去掉上清液，留底部 0.2 mL 液体，加 0.5 mL 受精液，在 CO₂ 培养箱中培养，使高活力精子上浮，取上层含有高活力精子的液体，计算悬浮液中精子密度，并调整受精液中的精子密度至受精密度的 2 倍，待用。

2.5.4 体外受精

每个含有卵母细胞的受精液滴中加入处理好的精液 50 μ L，使最终精子密度为 0.5~1 \times 10⁶，精子和卵母细胞在 CO₂ 培养箱中共孵育 (图 3)。

2.5.5 体外培养

受精结束后，将受精卵用胚胎培养液清洗 3 次，去除残留的颗粒细胞，移入胚胎培养盘，培养密度为 1 枚胚胎/2.5 μ L 培养液。38.5 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 饱和湿度培养，培养 10 h 时随机抽取部分卵母细胞检查多精入卵率，48 h 后观察卵裂率，7 d 观察囊胚，统计囊胚率 (图 4)。

2.3 统计分析

实验数据用 (Mean \pm SE) 表示。用 SPSS 17.0 的 ANOVA 过程进行分析。每个处理重复 3 次。当 $p < 0.05$ 时认为差异显著。同一列中数据的上角标不同表示差异显著 ($p < 0.05$)。

3 结果

3.1 公猪精液质量

本实验中在同一条件下，检测了 3 头种公猪的精液质量，由下表可以发现，三者精子密度、精子活率方面的检测值无显著差异 ($p > 0.05$)，在畸形率方面编号 28111 的种公猪精子畸形率 6.9 \pm 3.5%显著低于另外两头种公猪的 10.1 \pm 2.9%和 11.4 \pm 4.7%，另外两头种公猪之间差异不显著 ($p > 0.05$) (表 1)。

表 1 公猪精液质量

公猪个体	密度 (个/mL)	精子活率%	畸形率%
28111	(2.6 \pm 0.4) \times 10 ⁹ ^a	90.3 \pm 4.2 ^a	6.9 \pm 3.5 ^{a,b}
28206	(2.1 \pm 0.5) \times 10 ⁹ ^{ab}	94.1 \pm 3.3 ^a	10.1 \pm 2.9 ^a
29508	(3.3 \pm 0.3) \times 10 ⁹ ^a	88.5 \pm 4.5 ^a	11.4 \pm 4.7 ^a

注：同一列标注相同字母者为差异不显著 ($p > 0.05$)。

3.2 体内、体外的受精能力

在本实验中，用这三头种公猪分别与母猪进行本交，或人工采精并稀释后，用于人工授精或为体外成熟的卵母细胞进行体外受精，结果发现，三者与自然交配时，除 28111 号交配的母猪中有一头未受孕外，28206 号和 29508 号公猪交配的母猪全部受孕；用人工采精方法采集这三头公猪精液，用于人工输精，三者的受胎率分别为 95.2%、100%和 93.3%；在这两

组体内受精实验中,因参与实验的母猪头数较少,可能会因母猪的个体差异而产生实验误差,但大体也反映出这三头母猪在体内受精中的能力相似,这与 3.1 实验中三头公猪精液品质检测的各项指标无显著差异的结果基本符合。

用来自三头公猪的精液分别进行 IVF, 结果发现,三者精液在 IVF 中的能力有很大差异,囊胚率分别为 25.7%、17.2%和 6.3%, 差异极显著($p<0.05$) (表 2)。这个实验结果既与精液品质检测结果不一致,也与公猪在自然交配和人工授精时表现出来的受精能力不一致,说明在 IVF 时,对精液体外受精能力的判断,不能单纯参照其体内受精能力,也不能仅依靠精液的精子密度、活率和畸形率来做出结论。

表 2 不同公猪个体精液在体内、体外的受精能力

公猪个体	自然交配母猪 (头次)	受孕头数/ 受胎率%	人工授精母猪 (头次)	受孕头数/ 受胎率%	卵母细胞数 (个)	囊胚数/ 囊胚率%
28111	16	15/ 93.7% ^b	21	20/ 95.2% ^b	327	84(25.7±1.9) ^a
28206	13	13/ 100.0% ^a	24	24/ 100.0% ^a	147	25(17.2±1.6) ^b
29508	26	26/ 100.0% ^a	15	14/ 93.3% ^b	163	10(6.3±2.2) ^c

注: 同一列标注相同字母者为差异不显著($p>0.05$)。

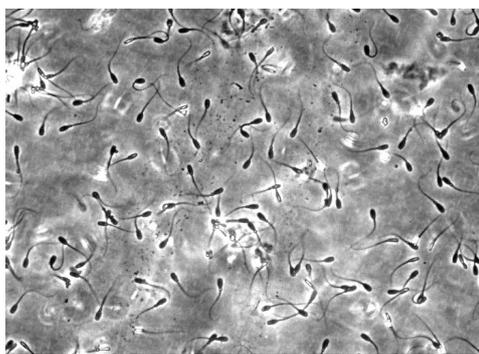


图 1 猪精子(100×)

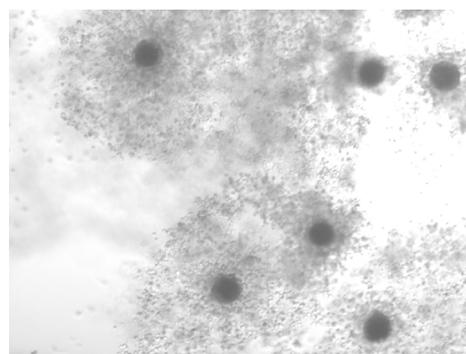


图 2 成熟卵母细胞(50×)

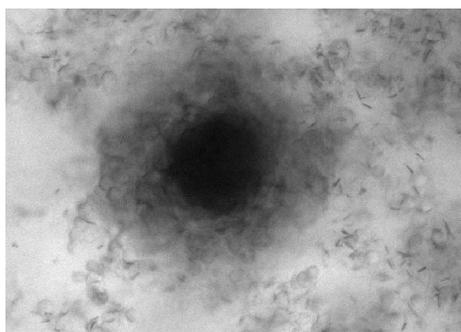


图 3 精卵共孵育(100×)

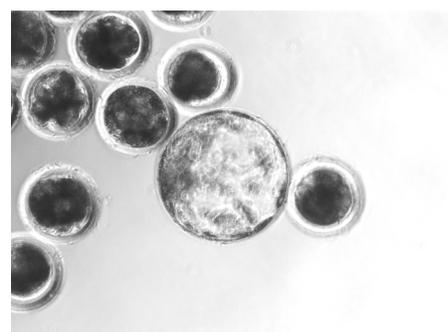


图 4 体外受精囊胚(100×)

4 讨论

在本实验中,检测了三头公猪的精液品质,并对比了它们的精液品质和在体内的受精能力,结果发现,三者的精液质量相似,在自然受精或人工授精实验中,受胎率有一定差异,但这种差异可能是由于本实验中用到的母猪数量有限,导致实验结果出现了偏离。这说明体内受精的成功率与精液质量相关性较大,精液品质相似前提下,体内受精的能力也相似。相比于体内受精实验的结果,用来自不同公猪个体的精液进行 IVF,则发现在精液品质相似的前提下,不同个体精液在 IVF 中表现出来的能力有很大差异,囊胚率分别为 25.7%、17.2%

和 6.3%。

这种精液在体内体外受精能力不同的现象在牛的 IVF 中也很明显。刘东军等选择五头公牛精液分别进行体外受精, 卵裂率范围在 17.6%到 74.7%之间变化, 而囊胚发育率则从 1.0%到 32.6%之间, 不同个体间差异极显著^[3]。周佳勃在山羊体外受精中也发现, 选用的 3 只公羊的精液在 IVF 后, 囊胚发育率分别为 8.16%、8.9%和 18.9%, 差异极其显著^[4]。这种精液受精能力在体内、体外表现不同的现象可能是由于在受精过程中体内和体外环境有很大不同, 参与体内受精过程中的某种重要的因子在人工模拟的体外环境中并没有被考虑进去。Slaweta R 等认为, 这可能与不同个体的精液中所含的谷胱甘肽 (GSH) 含量差异显著有关^[5]。在受精过程中, 精子产生大量的过氧化物歧化酶(ROS)会损伤精子膜和卵母细胞膜, 而 GSH 作为抗氧化剂则可以在一定程度上消除这种伤害, 达到保护精子和卵母细胞的目的, 进而提高胚胎的发育率^[6]。但在体外受精过程中, 精子经过清洗过程, 在除去精清等物质的同时, 也去除了绝大多数 GSH, 所剩的少部分 GSH 对受精是否有如此大的影响, 并不清楚。在本研究中发现, 精液品质相似的公猪在自然受精或人工授精中使母猪的受孕能力相似, 但精液品质不能反应其体外受精能力, 若进行体外胚胎生产, 还必须通过实验来筛选出适合于体外受精的公猪精液, 而不能单纯根据精液品质检测或生产中的表现决定。

5 小结

随着养猪业的发展, 对良种公猪的需求日益迫切, 利用先进的育种技术迅速推广良种公猪的优质基因, 促进猪群更新和商品猪质量是目前猪育种工作的重要内容^[7]。在基础研究领域也要求提供更多, 质量更好的体外受精胚胎进行各项机理研究。目前对精液的评价方法和采用的指标在指导自然受精和人工授精操作时比较有效, 能够反映公猪的受精能力, 但在体外受精时, 由于受精环境与体内有较大差别, 这些指标并不能说明其体外的受精能力。因此研究一套既适合于体内受精、同时又适合体外受精的精液品质评价标准, 将会更加有效地利用优良公猪资源, 推动我国生猪产业发展和基础科学研究, 也是今后的一个重要研究内容。

参考文献

- [1]李颖芳.猪人工授精存在的问题及对策.畜牧兽医杂志.2010,29(4):76-77.
- [2]朱健彬,张守全.猪人工授精技术和生猪遗传改良.猪业科学.2010,7:34-36.
- [3]刘东军,Brand.,M..不同种公牛精液对牛卵母细胞体外受精效果影响的研究.内蒙古大学学报.2000,31(3):307-310.
- [4]周佳勃,吴延光,罗明久,韩东,刘丽清,常仲乐,谭景和.影响山羊体外受精的因素.动物学报. 2004,50(2) : 216-221.
- [5] Slaweta R, Laskowska T, Szymańska E. Lipid peroxides, spermatozoa quality and activity of glutathione peroxidase in bull semen. Acta Physiol Pol. 1988.39(3):207-214.
- [6] Viet Linh N, Dang-Nguyen TQ, Nguyen BX, Manabe N, Nagai T. Effects of cysteine during in vitro maturation of porcine oocytes under low oxygen tension on their subsequent in vitro fertilization and development. J Reprod Dev. 2009;55(6):594-598.
- [7]周迪,范光慧,张庆刚,宋海.推广猪人工授精技术 促进现代生猪养殖业的发展.2010,4:53-54.