

血清及山羊卵丘细胞共培养对猪胚胎体外发育的促进作用

王慧利 李静心 王婧 孟春花
朱前明 张俊 钱勇 曹少先

江苏省农业科学院畜牧研究所/江苏省农业科学院动物品种改良和繁育重点实验室, 南京 210014

摘要 为进一步完善猪胚胎体外发育系统,以孤雌激活胚胎为研究对象,依次对胚胎培养液种类、培养期间血清添加方式、卵丘细胞共培养体系进行筛选优化。结果表明,与常规的PZM3培养液相比,CR1aa并不适合猪胚胎的体外发育;猪胚胎在PZM3中培养4 d后添加10%胎牛血清培养至第6天,体外发育能力得到显著改善,卵裂率、囊胚率、囊胚孵化率、囊胚细胞数分别达到95.1%、56.5%、27.3%、79.3;在此基础上,利用山羊卵丘细胞与猪胚胎进行共培养,将囊胚孵化率进一步提高至36.6%,初步建立了一套高效稳定的猪胚胎体外发育系统。

关键词 猪胚胎; 体外发育; 血清; 共培养; 凋亡

中图分类号 S 814.8 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2014)05-0073-07

近年来,猪卵母细胞体外成熟及胚胎体外发育的研究已取得长足进展,但仍存在成熟率不稳定、囊胚率尤其是囊胚孵化率偏低、囊胚细胞数偏少等问题,如何进一步提高猪卵母细胞和胚胎的体外生产效率仍值得研究。猪胚胎体外培养液主要有 North Carolina State University (NCSU) 和 Porcine Zygote Medium (PZM) 2 种系列。NCSU23 是最早成功用于猪胚胎体外发育的培养液,研究者通过对其能量底物的调整,已发展出许多衍生培养基,广泛用于猪胚胎的体外培养^[1-2]。以 PZM3 为代表的 PZM 系列与 NCSU 系列的主要区别在于添加了必需及非必需氨基酸,在培养猪合子期胚胎、孤雌胚胎、体外受精(IVF)及体细胞核移植(SCNT)胚胎方面,取得了优于 NCSU 的效果^[3-5]。但上述 2 种培养液均存在囊胚孵化率偏低及囊胚细胞数偏少的问题。Charles Rosenkrans 1 (CR1aa) 现普遍应用于牛羊胚胎的体外发育,并获得了较高的囊胚孵化率和囊胚细胞数^[6-10],能否相应改善上述猪胚胎体外发育缺陷值得研究。

血清内含有能量基质、氨基酸、维生素、激素、生长因子和细胞因子等多种成分,已广泛用于哺乳动物卵母细胞的体外成熟和胚胎的体外发育。有研究

者在猪胚胎培养期间添加胎牛血清(FBS),取得了不错的效果^[2,11-12],但更多研究者则选择牛血清白蛋白(BSA)用于猪胚胎的体外发育^[1,3,13],其中的 BSA 可替代血清起到维持渗透压、缓冲 pH 值、充当载体和提供营养的作用。因此,血清并非猪胚胎体外发育所必需,但适当添加可能会起到促进胚胎发育的作用。

卵丘细胞通过缝隙连接与卵母细胞保持密切联系,在卵母细胞成熟和受精过程中发挥重要作用^[14-15]。卵丘细胞共培养体系广泛应用于卵母细胞体外成熟及胚胎体外发育^[9,16-17],但猪卵母细胞中的相关研究多集中于卵丘细胞与裸卵共培养对成熟及发育的影响^[18-20],对卵丘细胞与孤雌胚胎共培养的研究相对较少,卵丘细胞共培养能否促进猪胚胎发育能力的提高值得探讨。本研究在课题组前期建立的猪卵母细胞体外发育系统的基础上^[21],以猪孤雌激活胚胎为研究对象,对其体外发育体系进一步优化。首先将 CR1aa 培养液应用于猪胚胎的体外发育,以寻求更适合的猪胚胎培养液,在此基础上,筛选获得猪胚胎体外培养过程中的最佳血清添加方案,进而利用猪、山羊、小鼠卵丘细胞与猪胚胎共培养,寻找有效的卵丘细胞共培养体系,以期建立高效

收稿日期: 2013-11-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(31101715)和江苏省农业科技自主创新资金项目(CX(11)4047)

王慧利,博士,副研究员,研究方向: 动物遗传繁育. E-mail: wanghui318@163.com

通信作者: 曹少先,博士,研究员,研究方向: 动物遗传繁育. E-mail: caoshaoxian@163.com

稳定的猪胚胎体外发育系统,为提高哺乳动物胚胎体外生产效率提供借鉴。

1 材料与方法

试验所需试剂除特殊说明外均购自 Sigma 公司。

1.1 猪卵母细胞体外成熟及胚胎体外发育

1) 卵母细胞获取与成熟。猪卵巢取自市郊屠宰场,于离体后 1 h 内运抵实验室,无菌生理盐水充分洗涤后抽取 3~6 mm 直径卵泡内卵母细胞,挑选卵丘致密完整、胞质均匀的卵丘卵母细胞复合体(COCs)进行成熟培养,操作过程注意全程保温(37℃)。基础成熟培养液为 TCM-199(Gibco),添加 10% 猪卵泡液、3.05 mmol/L 葡萄糖、0.1% 聚乙烯醇(PVA)、0.91 mmol/L 丙酮酸钠、10 ng/mL 表皮生长因子(EGF)、0.57 mmol/L 半胱氨酸。卵母细胞体外成熟 44 h,前 22 h 添加 10 IU/mL 孕马血清促性腺激素(PMSG)和 10 IU/mL 人绒毛膜促性腺激素(hCG),后 22 h 换为基础成熟培养液。培养条件为:38.5℃,5% CO₂,100% 湿度。

2) 孤雌激活与胚胎培养。于体外成熟 44 h 将卵母细胞取出,用透明质酸酶消化去除卵丘后挑选具有完整第一极体、胞质均匀的处于第二次减数分裂中期(MII)卵母细胞进行激活,激活方案为 1.2 kV/cm 电脉冲作用 30 μs 后 5 μg/mL 细胞松弛素 B(CB)处理 3 h。激活后的卵母细胞依试验设计放入相应胚胎培养液中培养。

3) 卵裂率、囊胚率、囊胚孵化率、囊胚细胞数检测。激活后 48 h 观察卵裂率,二细胞及以上记为卵裂;第 6 天观察囊胚率及囊胚孵化率,胚胎透明带变薄,胚体出现空腔记为囊胚;透明带破裂,胚胎从中扩展而出记为囊胚孵化;囊胚细胞计数采用 10 μg/mL Hoechst 33342 染色压片,于荧光显微镜下观察计数。

1.2 卵丘细胞共培养及共培养用卵丘细胞凋亡检测

1) 猪卵丘细胞共培养。体外成熟 44 h 的猪卵母细胞经透明质酸酶处理后,将脱落的卵丘细胞用含 10% FBS 的 DMEM 收集并培养于 96 孔细胞培养板,待贴壁后即依试验设计将 DMEM 更换为相应胚胎培养液以进行胚胎培养。

2) 山羊卵丘细胞共培养。山羊卵巢取自市郊屠宰场,充分洗涤后抽取卵泡内卵母细胞,挑选卵丘致

密完整、胞质均匀的 COCs 进行成熟培养,成熟培养液及培养条件与猪卵母细胞相同,体外成熟 24 h 后将卵母细胞取出,经透明质酸酶处理后,将脱落的卵丘细胞用含 10% FBS 的 DMEM 收集并培养于 96 孔细胞培养板,待贴壁后即依试验设计将 DMEM 更换为相应胚胎培养液以进行胚胎培养。

3) 小鼠卵丘细胞共培养。性成熟 ICR 小鼠注射 PMSG 后 48 h 注射 hCG,于 hCG 注射后 16 h 颈椎脱臼法处死,摘取输卵管后获得 COCs,COCs 经透明质酸酶处理后,将脱落的卵丘细胞用含 10% FBS 的 DMEM 收集并培养于 96 孔细胞培养板,待贴壁后即依试验设计将 DMEM 更换为相应胚胎培养液以进行胚胎培养。

4) 共培养用卵丘细胞凋亡检测。于胚胎培养期间或培养结束后,将共培养用猪卵丘细胞经 PBS 充分洗涤,10 μg/mL 的 propidium iodide(PI)于 37℃ 下染色 5~10 min,充分洗涤后,再用 10 μg/mL 的 Hoechst 33342 染色 5~10 min,经再次洗涤,荧光显微镜下用不同波长荧光观察并采集图像。设置凋亡阳性对照组,由胚胎培养结束后所获猪卵丘细胞经 2 mmol/L 的双氧水(H₂O₂)处理 2~3 h 获得。Hoechst 33342 所标记的细胞核发生固缩且 PI 同时着色的记为凋亡,Hoechst 33342 所标记的细胞核形态正常且 PI 未着色的记为未发生凋亡。

1.3 试验设计

1) 不同培养液对猪胚胎体外发育的影响。通过比较猪胚胎在 PZM3 和 CR1aa 两种培养液中的体外发育情况,验证与常规的 PZM3 相比,CR1aa 是否更有利于猪胚胎的体外发育。培养液配方见文献[3,7]。

2) 不同血清处理对猪胚胎体外发育的影响。利用本文“1.3”中 1) 筛选获得的胚胎培养液,在此基础上,对照组中不添加血清,试验组分别于胚胎培养的第 0、2、4 天添加 10% FBS 直至培养结束,通过比较各组处理的相关发育指标寻找最佳血清添加方案。

3) 卵丘细胞共培养对猪胚胎体外发育的影响。利用本文“1.3”中 2) 筛选获得的血清添加方案,在此基础上,分别采集猪、山羊和小鼠的卵丘细胞与猪胚胎进行共培养,探讨同种及异种卵丘细胞对猪胚胎体外发育的影响。在此期间,对胚胎培养过程中共培养用猪卵丘细胞的凋亡情况进行检测。

1.4 数据分析

每组试验至少重复 3 次。试验数据利用 SPSS 统计软件 (SPSS 11. 5) 进行单因素方差分析,结果以平均数±标准误表示, $P<0. 05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 不同培养液对猪胚胎体外发育的影响

不同培养液对猪胚胎体外发育的影响如表 1 所示,CR1aa 培养猪胚胎后,与常规的 PZM3 相比,卵裂率和囊胚孵化率差异不显著,但囊胚率和囊胚细胞数均显著下降。表明 CR1aa 培养液并不适合猪

胚胎的体外发育,后续试验仍采用 PZM3 作为体外发育用培养液。

2.2 不同血清处理对猪胚胎体外发育的影响

在 PZM3 中添加血清对猪胚胎的体外发育能力的试验结果如表 2 所示。各血清处理组的卵裂率与对照组差异不显著,但全程 (Day 0) 或者前半程 (Day 2) 添加血清会导致发育能力显著降低;而在后半程 (Day 4) 添加血清,在维持较高囊胚率 (56. 5%) 的同时,囊胚孵化率和囊胚细胞数均有显著提高,分别达到 27. 3% 和 79. 3。上述结果表明,适当添加血清可改善猪胚胎的体外发育能力。Day 4 方案所获囊胚及其细胞核染色情况见图 1。

表 1 不同培养液对猪胚胎体外发育的影响¹⁾

Table 1 Effect of different culture media on porcine embryos development *in vitro*

培养液 Culture media	胚胎类型 Type of embryos	培养胚胎数 Embryos cultured	卵裂率/% Cleavage rates	囊胚率/% Blastocyst rates	囊胚孵化率/% Hatched blastocyst rates	囊胚细胞数 Cell number of blastocysts
PZM3	Pig	89	98. 9±1. 1 a	52. 8±3. 9 a	10. 0±5. 1 a	63. 0±4. 4 a
CR1aa	Pig	78	92. 4±3. 6 a	26. 6±1. 8 b	14. 1±7. 1 a	42. 2±2. 7 b

1) 同列不同小写字母间差异显著 ($P<0. 05$), 下表同。PZM3;猪胚胎用 PZM3 培养 6 d; CR1aa;猪胚胎用 CR1aa 培养 6 d。The different letters in the same column indicate significant difference ($P<0. 05$), the same as follows. PZM3; Porcine embryos were cultured in PZM3 for 6 days; CR1aa; Porcine embryos were cultured in CR1aa for 6 days.

表 2 不同血清处理对猪胚胎体外发育的影响¹⁾

Table 2 Effect of different fetal bovine serum treatment on porcine embryos development *in vitro*

血清处理 Serum treatment	培养胚胎数 Embryos cultured	卵裂率/% Cleavage rates	囊胚率/% Blastocyst rates	囊胚孵化率/% Hatched blastocyst rates	囊胚细胞数 Cell number of blastocysts
对照 Control	92	95. 6±1. 1 a	53. 4±6. 6 a	8. 8±6. 5 a	61. 5±5. 8 a
Day 0	88	91. 9±1. 0 a	23. 4±2. 8 b	0. 0±0. 0 a	39. 9±3. 3 b
Day 2	82	93. 3±2. 0 a	22. 9±2. 3 b	0. 0±0. 0 a	36. 7±3. 1 b
Day 4	83	95. 1±2. 5 a	56. 5±2. 5 a	27. 3±7. 1 b	79. 3±9. 2 c

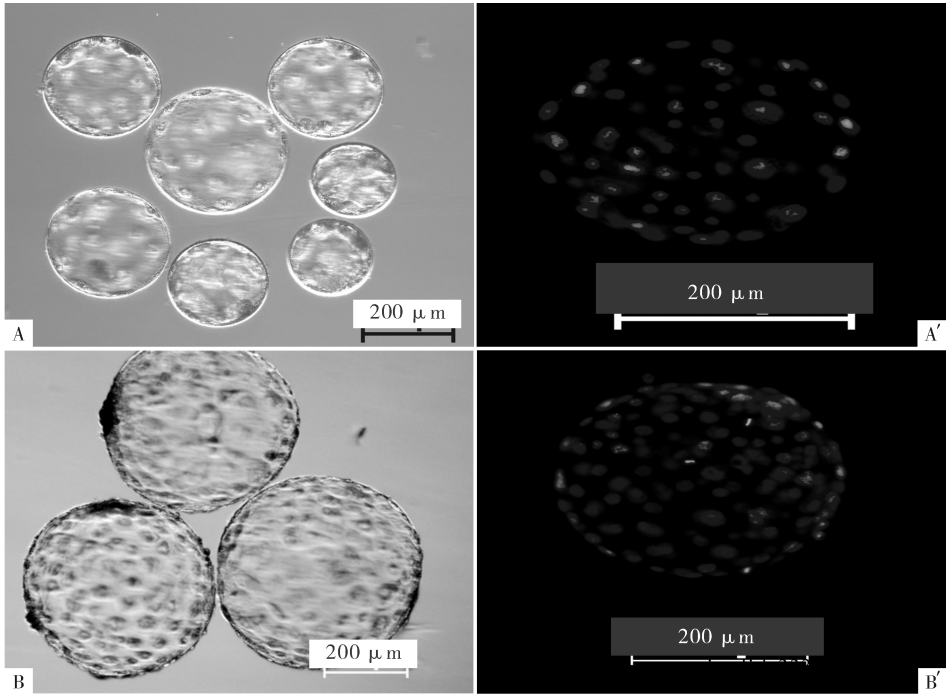
1) Control; PZM3 全程培养 6 d; Day 0; PZM3+10% FBS 全程培养 6 d; Day 2; PZM3 培养至第 2 天后添加 10% FBS 培养至第 6 天; Day 4; PZM3 培养至第 4 天后添加 10% FBS 培养至第 6 天。Control; Embryos were cultured in PZM3 for 6 days; Day 0; Embryos were cultured in PZM3 with 10% FBS for 6 days; Day 2; Embryos were cultured in PZM3 from Day 0 to 2 and then PZM3 with 10% FBS from Day 2 to 6; Day 4; Embryos were cultured in PZM3 from Day 0 to 4 and then PZM3 with 10% FBS from Day 4 to 6.

2.3 卵丘细胞共培养对猪胚胎体外发育的影响

1) 同种卵丘细胞共培养对猪胚胎体外发育的影响。本试验在获得的最佳血清添加方案 (Day 4 方案) 的基础上,结合卵丘细胞共培养,以进一步提高猪胚胎的体外发育能力。结果如表 3 所示,利用猪卵丘细胞与猪胚胎进行共培养后,与未共培养的对照组相比,各项发育指标均差异不显著,表明猪卵丘

细胞未能改善猪胚胎体外发育能力。

2) 猪胚胎体外发育过程中共培养用卵丘细胞凋亡情况检测。本试验对共培养期间所用的猪卵丘细胞的凋亡情况进行检测,以明确细胞凋亡对猪胚胎发育的影响。如图 2 所示,于胚胎培养第 6 天检测共培养用猪卵丘细胞凋亡情况,PI 染色呈阴性 (A),且 Hoechst 33342 所染细胞核形态正常 (A');而在



A:普通囊胚光镜照片;A':普通囊胚经 Hoechst 33342 染色后的荧光照片。A:White light image of porcine blastocysts; A':Fluorescent image of blastocyst stained with Hoechst 33342. B:孵化囊胚光镜照片;B':孵化囊胚经 Hoechst 33342 染色后的荧光照片。B:White light image of porcine hatched blastocysts; B':Fluorescent image of hatched blastocyst stained with 33342.

图 1 普通囊胚、孵化囊胚及其 Hoechst 33342 细胞核染色

Fig.1 Porcine blastocysts and hatched blastocysts with nuclei stained with Hoechst 33342

表 3 同种卵丘细胞共培养对猪胚胎体外发育的影响¹⁾

Table 3 Effect of coculture with homogenous cumulus cells on porcine embryos development *in vitro*

处理 Treatment	培养胚胎数 Embryos cultured	卵裂率/% Cleavage rates	囊胚率/% Blastocyst rates	囊胚孵化率/% Hatched blastocyst rates	囊胚细胞数 Cell number of blastocysts
对照 Control	90	95.7±2.2 a	56.2±9.4 a	25.0±4.8 a	78.7±10.4 a
共培养 Coculture	84	95.1±1.4 a	52.5±1.2 a	27.5±4.6 a	79.4±10.5 a

1)胚胎培养均采用 Day 4 方案(PZM3 培养至第 4 天后添加 10% FBS 培养至第 6 天)。对照(Control):未进行猪卵丘细胞共培养;共培养(Coculture):猪卵丘细胞与猪胚胎进行共培养。Embryos cultured with Day 4 treatment (embryos were cultured in PZM3 from Day 0 to 4 and then PZM3 with 10% FBS from Day 4 to 6). Control:Porcine embryos without coculture; Coculture:Coculture of porcine embryos with porcine cumulus cells.

凋亡阳性对照组中,经同样染色程序处理后发生明显凋亡,多数细胞 PI 染色呈阳性(B),并且 Hoechst 33342 所标记细胞核发生明显固缩(B')。上述结果表明,共培养期间猪卵丘细胞并未发生凋亡。

考虑到采取的 Day 4 培养方案是于胚胎培养第 4 天添加血清,而在此之前,共培养用卵丘细胞一直在无血清的 PZM3 中生长,存在卵丘细胞在前期已发生凋亡、但在添加血清后又恢复正常并导致凋亡检测呈阴性的可能。为验证这一推测,于胚胎培养第 4 天,即添加血清之前,对卵丘细胞凋亡情况进行检测,但与第 6 天的结果一致,仍未检测到凋亡(图

片未列),表明共培养用猪卵丘细胞的确未发生凋亡。

3)异种卵丘细胞共培养对猪胚胎体外发育的影响。胚胎培养均采用 Day 4 方案(PZM3 培养至第 4 天后添加 10% FBS 培养至第 6 天)。利用异种卵丘细胞与猪胚胎共培养后,与对照组相比,小鼠卵丘细胞共培养未能改善相关发育指标,而山羊卵丘细胞与猪胚胎共培养后,卵裂率、囊胚率、囊胚细胞数与对照组差异不显著,但囊胚孵化率却得到了进一步的提高,达 36.6%(表 4)。上述结果表明,共培养系统中,卵丘细胞对胚胎发育的影响具有种属特异性。

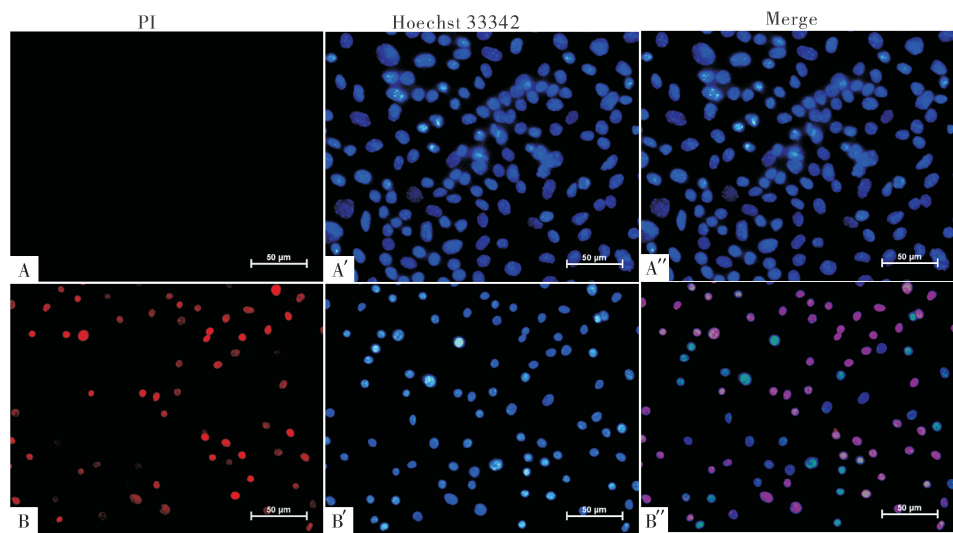


图 2 猪胚胎体外发育过程中共培养用卵丘细胞凋亡情况检测

Fig. 2 Detection of apoptosis in cumulus cells cocultured with porcine embryos during *in vitro* development

表 4 异种卵丘细胞共培养对猪胚胎体外发育的影响¹⁾

Table 4 Effect of coculture with heterogeneous cumulus cells on porcine embryos development *in vitro*

处理 Treatment	培养胚胎数 Embryos cultured	卵裂率/% Cleavage rates	囊胚率/% Blastocyst rates	囊胚孵化率/% Hatched blastocyst rates	囊胚细胞数 Cell number of blastocysts
对照 Control	88	92.3±2.5 a	53.3±3.7 a	23.7±2.4 a	75.9±8.0 a
共培养-山羊 Coculture-goat	83	92.8±2.1 a	53.2±1.4 a	36.6±3.4 b	77.7±7.8 a
共培养-小鼠 Coculture-mouse	86	94.1±1.3 a	53.5±0.9 a	24.3±3.4 a	75.3±9.4 a

1)对照(Control):未进行卵丘细胞共培养;共培养-山羊(Coculture-goat):山羊卵丘细胞与猪胚胎进行共培养;共培养-小鼠(Coculture-mouse):小鼠卵丘细胞与猪胚胎进行共培养。Control:Porcine embryos without coculture; Coculture-goat:Coculture of porcine embryos with goat cumulus cells; Coculture-mouse:Coculture of porcine embryos with mouse cumulus cells.

3 讨 论

与其它动物相比,猪卵母细胞体外发育系统尚有待改进。采用 PZM 或 NCSU 系列培养液,研究者获得的囊胚率及囊胚细胞数多介于 5%~40%、15~50 之间^[1-2,4-5,22],仅有少数研究者获得的囊胚率达到 50%,细胞数超过 50^[3,23],而且关注囊胚孵化率的研究很少^[2-3]。CR1aa 培养液在培养牛和山羊胚胎时获得了较高的囊胚率和囊胚细胞数^[7,9-10],并且课题组利用 CR1aa 培养山羊孤雌胚胎也取得了良好的发育效果,囊胚率、囊胚孵化率分别达到 50%、80%,囊胚细胞数超过 200(数据尚未发表)。基于此,笔者将其用于猪胚胎的体外培养,以期改善猪胚胎体外发育中存在的囊胚孵化率较低、囊胚细胞数较少的问题。但在应用 CR1aa 后,与 PZM3 相

比,猪胚胎的各项发育指标并未得到改善,而且囊胚率和囊胚细胞数还出现显著降低的现象。这表明不同物种胚胎体外发育期间对培养液的营养需求有所差异,CR1aa 更适合山羊胚胎的体外发育,PZM3 更适合猪胚胎的体外发育。

研究表明,NCSU23 中添加血清可显著提高猪胚胎的体外发育能力^[2],因此,作者也尝试在 PZM3 中添加血清以期进一步提高猪胚胎的体外发育能力。结果显示,过早添加血清会损害猪胚胎的发育能力,但在培养后期(Day 4)添加血清则会显著提高囊胚孵化率及囊胚细胞数。表明猪胚胎体外发育过程中对血清的需求具有阶段特异性,不同阶段胚胎的营养需求或者利用血清的能力存在差异。

卵丘细胞可提供多种营养物质并分泌各种生长因子促进卵母细胞发育,众多研究结果也表明卵丘

细胞共培养可显著提高卵母细胞的成熟及发育能力^[16-20]。本研究将猪卵丘细胞共培养体系用于猪胚胎的体外发育,但并未改善相关发育指标,考虑到胚胎体外培养时间相对较长(6 d),是否在此期间共培养用卵丘细胞已发生凋亡,导致发育促进作用不显著?因此进一步对共培养用猪卵丘细胞的凋亡情况进行了检测。但结果显示,猪卵丘细胞在共培养期间并未发生凋亡。共培养未能促进胚胎发育是否由猪卵丘细胞本身特性所决定?更换卵丘细胞的种类能否有所改观?后续试验中,分别采集异种的山羊和小鼠卵丘细胞与猪胚胎进行共培养,以期进一步促进猪胚胎体外发育能力的提高。结果发现,小鼠卵丘细胞也未能发挥发育促进作用,但山羊卵丘细胞共培养显著改善了猪胚胎的囊胚孵化率。我们推测,卵丘细胞对胚胎发育的作用具有种属特异性,猪和小鼠卵丘细胞本身可能存在某种缺陷,不能充分利用现有培养液成分合成胚胎发育所需物质。因为有研究者利用同种的牛卵丘细胞和异种的小鼠卵丘细胞与牛裸卵共培养后也未改善裸卵的卵裂率和孤雌囊胚率^[24]。另有研究表明,小鼠卵丘细胞不能利用培养液中的半胱胺和胱氨酸合成谷胱甘肽以改善胞质成熟质量,但山羊卵丘细胞则可利用并因此提高了小鼠的囊胚发育率^[16]。

综上所述,通过更换胚胎培养液类型、优化血清添加方式并利用卵丘细胞与胚胎进行共培养,显著改善了猪胚胎的体外发育。利用 PZM3 培养液,在胚胎培养第 4 天添加 10% 胎牛血清,并结合山羊卵丘细胞共培养,卵裂率、囊胚率、囊胚孵化率及囊胚细胞数分别超过 90%、50%、30%、70,显著改善了猪体外成熟卵母细胞的发育系统。上述各项优良发育指标的获得主要得益于相关发育方案的优化,也得益于试验操作细节的控制。与其它动物相比,猪卵母细胞中存在大量脂类,低温时可由液晶态变成晶态,导致细胞失去正常功能,甚至死亡,因此对温度非常敏感。本研究所用卵母细胞取材新鲜,于卵巢离体 1 h 内即运抵实验室,并且全程保温(37 ℃)操作,最大程度保证了卵母细胞发育能力不受低温损害。通过上述发育方案的优化并结合试验细节的控制,本研究初步建立了一套稳定高效的猪胚胎体外发育系统。

参 考 文 献

- [1] KIKUCHI K, ONISHI A, KASHIWAZAKI N, et al. Successful piglet production after transfer of blastocysts produced by a modified *in vitro* system[J]. *Biol Reprod*, 2002, 66(4): 1033-1041.
- [2] KIM H S, LEE G S, HYUN S H, et al. Improved *in vitro* development of porcine embryos with different energy substrates and serum[J]. *Theriogenology*, 2004, 61(7/8): 1381-1393.
- [3] YOSHIOKA K, SUZUKI C, TANAKA A, et al. Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium[J]. *Biol Reprod*, 2002, 66(1): 112-119.
- [4] IM G S, LAI L, LIU Z, et al. *In vitro* development of preimplantation porcine nuclear transfer embryos cultured in different media and gas atmospheres[J]. *Theriogenology*, 2004, 61(6): 1125-1135.
- [5] YAMANAKA K, SUGIMURA S, WAKAI T, et al. Difference in sensitivity to culture condition between *in vitro* fertilized and somatic cell nuclear transfer embryos in pigs[J]. *J Reprod Dev*, 2009, 55(3): 299-304.
- [6] ROSENKRANS C F J R, ZENG G Q, MCNAMARA G T, et al. Development of bovine embryos *in vitro* as affected by energy substrates[J]. *Biol Reprod*, 1993, 49(3): 459-462.
- [7] SAGIRKAYA H, MISIRLIOGLU M, KAYA A, et al. Developmental and molecular correlates of bovine preimplantation embryos[J]. *Reproduction*, 2006, 131(5): 895-904.
- [8] KOESTER M, MOHAMMADI-SANGCHESHMEH A, MONTAG M, et al. Evaluation of bovine zona pellucida characteristics in polarized light as a prognostic marker for embryonic developmental potential[J]. *Reproduction*, 2011, 141(6): 779-787.
- [9] ZHOU P, WU Y G, LI Q, et al. The interactions between cysteamine, cystine and cumulus cells increase the intracellular glutathione level and developmental capacity of goat cumulus-denuded oocytes[J]. *Reproduction*, 2008, 135(5): 605-611.
- [10] TAE J C, KIM E Y, LEE W D, et al. Sterile filtered paraffin oil supports *in vitro* developmental competence in bovine embryos comparable to co-culture[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2006, 23(3): 121-127.
- [11] ESAKI R, UEDA H, KUROME M, et al. Cryopreservation of porcine embryos derived from *in vitro*-matured oocytes[J]. *Biol Reprod*, 2004, 71(2): 432-437.
- [12] NAGASHIMA H, HIRUMA K, SAITO H, et al. Production of live piglets following cryopreservation of embryos derived from *in vitro*-matured oocytes[J]. *Biol Reprod*, 2007, 76(5): 900-905.
- [13] JIN H F, KUMAR B M, KIM J G, et al. Enhanced development of porcine embryos cloned from bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Int J Dev Biol*, 2007, 51(1): 85-90.
- [14] ZHANG L, JIANG S, WOZNIAK P J, et al. Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development *in vitro* [J]. *Mol Reprod Dev*, 1995, 40(3): 338-344.
- [15] TANGHE S, VAN SOOM A, NAUWYNCK H, et al. Minireview: functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation

tion, ovulation, and fertilization[J]. Mol Reprod Dev, 2002, 61(3):414-424.

[16] ZHOU P, WU Y G, WEI D L, et al. Mouse cumulus-denuded oocytes restore developmental capacity completely when matured with optimal supplementation of cysteamine, cystine, and cumulus cells[J]. Biol Reprod, 2010, 82(4):759-768.

[17] WANG H L, CHANG Z L, LI K L, et al. Caffeine can be used for oocyte enucleation[J]. Cell Reprogram, 2011, 13(3):225-232.

[18] MAEDOMARI N, KIKUCHI K, OZAWA M, et al. Cytoplasmic glutathione regulated by cumulus cells during porcine oocyte maturation affects fertilization and embryonic development *in vitro* [J]. Theriogenology, 2007, 67(5):983-993.

[19] JU S, RUI R. Effects of cumulus cells on *in vitro* maturation of oocytes and development of cloned embryos in the pig[J]. Reprod Domest Anim, 2012, 47(4):521-529.

[20] ZHANG X, MIAO Y, ZHAO J G, et al. Porcine oocytes denuded before maturation can develop to the blastocyst stage if provided a cumulus cell-derived coculture system[J]. J Anim Sci, 2010, 88(8):2604-2610.

[21] 王慧利, 孟春花, 张庆晓, 等. 猪卵母细胞体外发育系统的优化及转基因体细胞核移植系统的建立[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(6):1325-1329.

[22] KARJA N W, MEDVEDEV S, ONISHI A, et al. Effect of replacement of pyruvate/lactate in culture medium with glucose on preimplantation development of porcine embryos *in vitro* [J]. J Reprod Dev, 2004, 50(5):587-592.

[23] BEEBE L F, MCILFATRICK S M, VASSILIEV I M, et al. Development of an improved porcine embryo culture medium for cloning, transgenesis and embryonic stem cell isolation[J]. Clon Transgen, 2013, 2(2):107.

[24] 任晶晶, 赵学明, 秦彤, 等. 小鼠卵丘细胞对牛卵母细胞体外成熟和孤雌发育的影响[J]. 农业生物技术学报, 2012, 20(4):411-419.

Effects of serum and coculture with goat cumulus cells on *in vitro* development of porcine embryos

WANG Hui-li LI Jing-xin WANG Jing MENG Chun-hua
ZHU Qian-ming ZHANG Jun QIAN Yong CAO Shao-xian

*Institute of Animal Science, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/
Key Laboratory of Animal Breeding and Reproduction, Jiangsu Academy
of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China*

Abstract To further improve the *in vitro* development systems of porcine embryos, we optimized the types of embryo culture media, the methods of serum treatment during embryo culture, the effects of coculture with cumulus cells on embryos development *in vitro*, using porcine parthenogenetic embryos as a model. The results demonstrated that porcine zygote medium-3(PZM3) was the suitable medium for *in vitro* culture of porcine embryos compared with Charles Rosenkrans 1 (CR1aa). Cultured in PZM3 from Day 0 to 4 and then added 10% fetal bovine serum from Day 4 to 6, porcine embryos showed the higher developmental capacity, with the cleavage rates, blastocyst rates, hatched blastocyst rates and cell number of blastocysts of 95.1%, 56.5%, 27.3% and 79.3 respectively. Based on the above, we cocultured porcine embryos with goat cumulus cells and further improved the hatched blastocyst rates to 36.6%, suggesting an efficient and stable *in vitro* development systems of porcine embryos was established preliminarily.

Key words porcine embryos; *in vitro* development; serum; coculture; apoptosis

(责任编辑:边书京)