

天祝白牦牛超排过程中卵泡闭锁的初步研究

樊江峰, 王世雷, 李天强, 徐庚全, 王立斌, 余四九^{*} (甘肃农业大学动物医学院, 甘肃兰州 730070)

摘要 [目的] 全面监测天祝母白牦牛超排过程中卵巢的变化情况。[方法] 对 12 头健康成年天祝母白牦牛采用 CIDR + FSH + PG 的超数排卵处理, 并运用超声探测技术对超排过程中卵巢的变化情况做了全程监测。[结果] 在处理的 12 头牛中有 5 头监测到明显的卵泡闭锁现象。在超排处理前期, 这 5 头的卵巢直径逐渐增大, 到第 10 天达到最大值, 平均 (3.39 ± 0.65) cm, 之后又开始逐渐缩小; 卵巢上最大卵泡的直径也在第 10 天达到最大值, 平均 13.6 ± 2.6 mm; 优势卵泡从第 8 天开始大量出现, 到第 10 天达到最多, 平均每个卵巢有 6.5 ± 2.3 个; 此后这些优势卵泡的直径逐渐缩小, 在 B 超图上未看到黄体影像, 说明这类卵泡没有正常排卵, 而是最终走向了闭锁。[结论] 该研究为评价及优化超排处理方案提供准确可靠的依据。

关键词 天祝白牦牛; 超数排卵; 卵泡闭锁

中图分类号 S823.8⁺5 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)20-08612-03

Preliminary Research on the Follicular Atresia during Super Ovulation in Tianzhu White Yak

FAN Jiang-feng et al (Medical College of Animal, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070)

Abstract [Objective] The aim of the research was to monitor the changes of ovary in female Tianzhu white yak during super ovulation completely. [Method] Twelve healthy adults of female Tianzhu white yaks were treated by CIDR + FSH + PG super ovulation and the changes of ovary during super ovulation were monitored by ultrasonic detecting technology in the whole course. [Result] There were obvious follicular atresia phenomena monitored in 5 yaks among the treated 12 yaks. During the early stage of super ovulation treatment, the ovary diameters of the 5 yaks increased gradually and reached the maximum on the 10th day, with average of (3.39 ± 0.65) cm, and then reduced gradually. The diameter of the biggest follicular in ovary also reached the maximum on the 10th day, with average of (13.6 ± 2.6) mm. The dominant folliculars started to appear massively from the 8th day and reached the most till the 10th day and each ovary had (6.5 ± 2.3) folliculars averagely. Then the diameters of these dominant folliculars reduced gradually and the images of corpus luteum were not seen in B-scan, indicating that these folliculars did not ovulate normally, but went into atresia at last. [Conclusion] The research supplied accurate and reliable basis for evaluating and optimizing super ovulation plan.

Key words Tianzhu white yak; Super ovulation; Follicular atresia

天祝白牦牛是分布在甘肃省天祝县境内、海拔 3 000 m 以上的高寒草原上的牦牛地方品种, 是经过长期的自然选择和人工选育而形成的地方特有畜种, 是世界稀有而珍贵的牦牛种质资源, 已被列入《中国畜禽品种志》。然而, 由于天祝白牦牛的繁殖能力低下, 加之黑牦牛对其的遗传污染, 纯种的天祝白牦牛数量越来越少, 应用胚胎移植技术扩繁白牦牛数量不失为一种行之有效的种质资源保护手段。

卵泡闭锁 (Follicular atresia) 是卵泡发育到一定阶段后停止发育并退化的现象, 哺乳动物的卵泡闭锁是一种正常的繁殖生理过程^[1]。牦牛的繁殖生理特性与其他牛基本相似^[2-3], 大多 2 年 1 胎, 平均一生能生产 4~5 头牛犊, 且其繁殖活动有明显的季节性^[4]。许多学者先后研究报道了牦牛超数排卵的方法和特性^[5-6], 余四九等在 2004 年以黑牦牛为受体应用胚胎移植技术首次成功繁育出白牦牛后代^[7], 但研究发现白牦牛胚胎移植的效果仍然很不稳定, 往往在超排初期卵巢体积逐渐增大, 在排卵前后却突然缩小而不排卵, 也不能形成黄体。超数排卵无疑是胚胎移植过程中的关键环节, 这可能是造成胚胎移植成功率较低的主要原因。为此, 笔者应用 B 型超声波诊断仪对卵巢发育的状况做了检测, 发现在超排过程中卵巢卵泡系统存在广泛的闭锁现象, 并首次对超排过程中卵巢的变化做了全面的监测与描述, 为评价以及优化超排处理方案提供更为准确可靠的依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物及试验地

2007 年 8 月选用天祝白牦牛育种

场健康成年母白牦牛 12 头 (年龄 6~8 岁, 体重 130~205 kg) 进行超排处理, 其中 5 头监测到明显的卵泡闭锁现象。天祝白牦牛育种场位于 102°01'E 36°30'N, 海拔 2 900 m, 年平均气温为 -1~3 °C, 年降雨量为 265~632 mm。

1.2 仪器及药品 荷兰 Tringa 50 s 兽用 B 超诊断仪, 5.0 MHz 线阵探头; 氯前列烯醇 (PG, 上海市计划生育科学研究所); (牛) 天然孕酮阴道栓 (上海市计划生育科学研究所); 促卵泡素 (FSH, 加拿大); 阴道孕酮海绵栓 (CIDR-B, 每只含有 1.9 g 孕酮, InterAg, Hamilton, 新西兰)。

1.3 超数排卵处理 在母牛发情周期的任意 1 d 放置阴道孕酮海绵栓, 记为起始日第 0 天。第 5 天开始注射促卵泡素, 每天 2 次, 共 8 次, 总量为 20 ml, 第 7 次和第 8 次同时注射 PG 2 mg, 第 8 天下午撤除孕酮栓。

1.4 卵巢发育状况的监测 卵巢发育状况的 B 超监测在每天下午注射药物之前进行。首先妥善保定牦牛, 清除直肠宿粪进行直肠检查, 并用手隔着直肠壁确定两侧卵巢的大体位置、形状和大小。然后手呈锥形将 B 超探头握入掌心并带入直肠中。根据直肠检查时确定的大概位置, 将探头慢慢靠近一侧卵巢, 并观察显示屏, 直到出现卵巢的轮廓为止; 调整探头的方向和位置, 将卵巢图像拉到屏幕中间并使图像达到最清晰。然后将探头对准卵巢中心, 沿探头长轴旋转探头直到图像上卵巢轮廓的长度达到最大, 保存图片, 测量图片中卵巢轮廓的长径。参照文献 [8]、[9] 对卵泡的分类方法计数优势卵泡以上大小的卵泡 (≥ 9.0 mm) 数量和最大卵泡直径。

1.5 统计分析 卵巢长径、卵泡最大直径和优势卵泡的数量均为同 1 d 各个样本左右卵巢的平均值。

基金项目 甘肃省攻关项目 (2GS042-A41-001-05)。

作者简介 樊江峰 (1980-), 男, 甘肃静宁人, 博士研究生, 研究方向: 动物医学工程。* 通讯作者。

收稿日期 2008-05-12

2 结果与分析

2.1 超排过程中卵巢大小的变化 放置孕酮阴道海绵栓的当天(第0天)卵巢相对较小,长径(1.43 ± 0.71)cm;此后,卵巢长径变化很小,直到第5天开始注射FSH,卵巢才逐渐增长,到第10天达到最大值(3.39 ± 0.65)cm;第10~13天卵巢长径明显减小(表1、图1)。

2.2 超排过程中卵巢最大卵泡直径的变化 从B超监测结果来看,超排过程中卵巢上最大卵泡的直径变化情况基本与卵巢体积相一致。从处理的第7天开始,卵泡开始生长,到第10天迅速增大,平均达到(13.6 ± 2.6)mm。以后又开始逐渐缩小(表1),但在B超图像上没有看到排卵后形成黄体或者黄体(图2)。

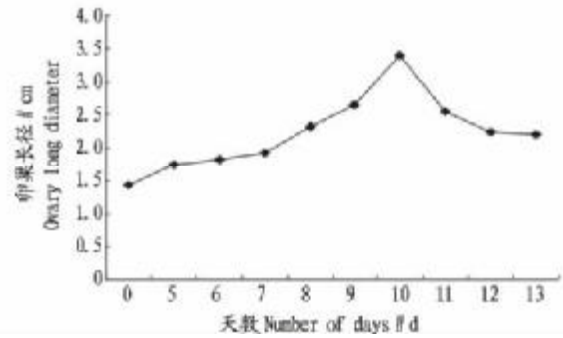


图1 超排过程中卵巢大小的变化曲线

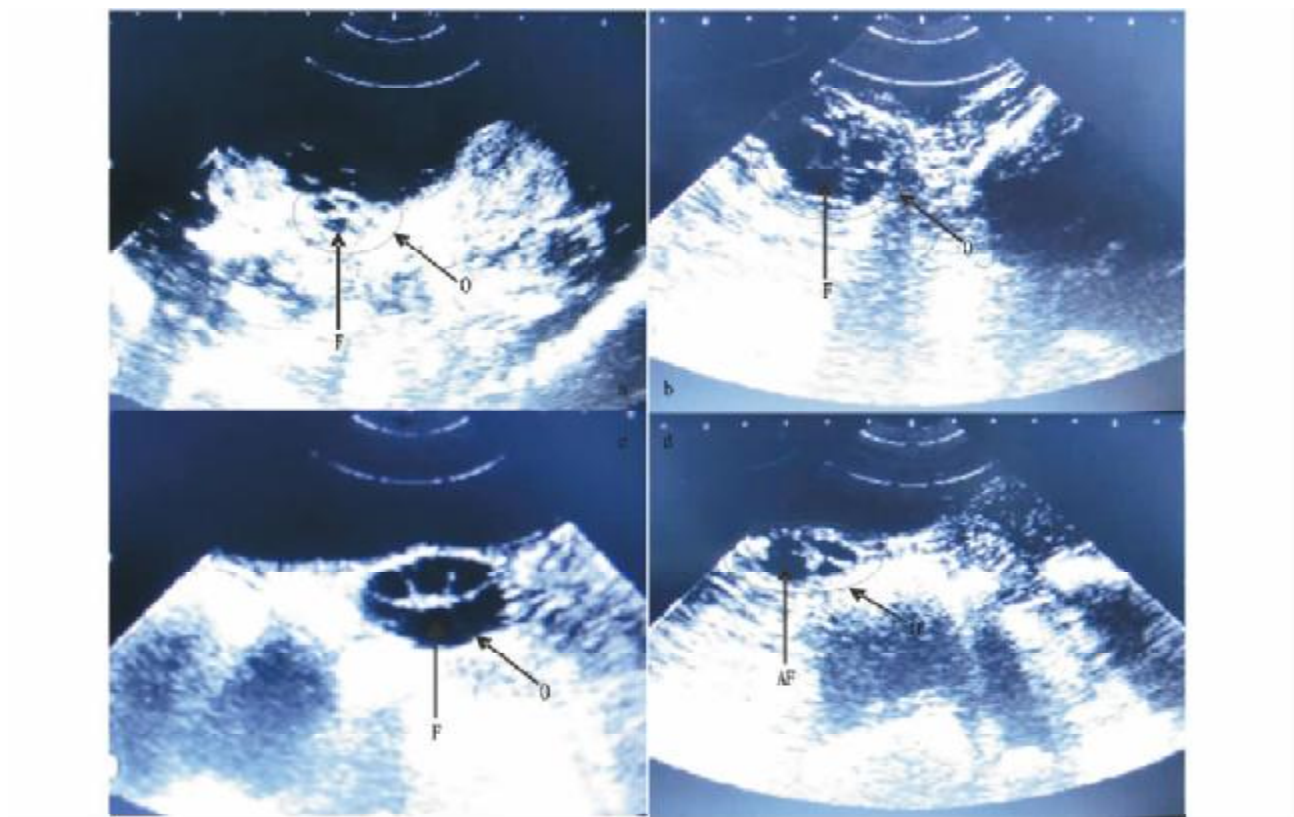
Fig. 1 Change curve of ovary size during superovulation

2.3 超排过程中卵巢优势卵泡的数目变化 在超排过程中,

表1 超排过程中卵巢大小、最大卵泡直径以及优势卵泡数目的变化

Table 1 Changes of ovary size, maximum follicular diameter and dominant follicle number during superovulation

天数//d Number of days	卵巢长径//cm Ovary long diameter	最大卵泡直径//mm Maximum follicular diameter	优势卵泡数目(≥9 mm)//个 Dominant follicle number
0	1.43 ± 0.71	4.8 ± 1.2	0.4 ± 0.2
5	1.73 ± 0.47	5.2 ± 2.3	0.5 ± 0.2
6	1.82 ± 0.62	5.1 ± 2.8	1.6 ± 0.7
7	1.91 ± 0.58	6.3 ± 1.9	2.4 ± 0.9
8	2.33 ± 0.67	7.2 ± 3.4	5.9 ± 1.3
9	2.64 ± 0.59	12.1 ± 3.1	6.2 ± 1.9
10	3.39 ± 0.65	13.6 ± 2.6	6.5 ± 2.3
11	2.55 ± 0.55	11.0 ± 3.3	6.3 ± 1.5
12	2.25 ± 0.59	9.6 ± 2.9	5.6 ± 2.6
13	2.20 ± 0.84	6.1 ± 2.7	5.1 ± 2.1



注:O. 卵巢;F. 卵泡;AF. 闭锁卵泡。a. 第0天;b. 第8天;c. 第10天;d. 第13天。

Note: O. Ovary; F. Follicular; AF. Atresic follicular; a. The 0th day; b. The 8th day; c. The 10th day; d. The 13th day.

图2 3号白牦牛超排过程中右侧卵巢变化的B超扫描图

Fig. 2 The B-mode ultrasonic scanned image of 3# white yak's right ovary during superovulation

从 B 超的监测结果可以看出,大量优势卵泡出现的时间主要从第 8 天开始,平均能够达到每个卵巢(5.9 ± 1.3)个,以后优势卵泡的数目增多不太明显,到第 10 天达到最多,约有(6.5 ± 2.3)个,此后 9 mm 以上卵泡的数目基本保持不变,直到第 13 天开始明显减少(表 1)。

3 讨论

(1)超数排卵是胚胎移植技术中的关键环节,超数排卵的效果直接关系到获得可用胚胎的数量和质量。笔者在天祝开展了多年的白牦牛胚胎移植技术研究,发现作为一种繁殖活动有明显季节性的家畜,白牦牛的超排效果很不稳定^[7]。在超排的早期阶段,卵巢发育良好,有大量的选择卵泡被募集而增大成为优势卵泡。然而,这些优势卵泡的发展去向有所不同,有些个体中可以充分发育最后排卵而形成黄体,卵巢的体积也会因黄体的形成而继续维持较大的尺寸;另外一些个体优势卵泡的发育不充分,也不能排卵,而是经过一段时间的生长期后体积逐渐缩小,始终没有黄体的形成,造成超排处理的失败。这可能与超排处理开始时牦牛所处的繁殖周期阶段、自身营养水平、当地气候条件等多方面的因素有关,详细的影响机理还有待深入研究。笔者应用 B 超技术对超数排卵过程中卵巢的发育状况做了全程监测,详细记录了这一类不排卵卵泡的发育过程。

(2)B 型超声快速诊断法即时 B 超诊断法在 20 世纪 70 年代兴起,80 年代始用于家畜繁殖学,其最大优点在于它的非损伤性,即可在未损伤动物繁殖性能的情况下进行重复检查。这使其在牛繁殖领域成为一种出色的临床诊断和研究方法,并已经为许多利用其他方式无法解决的有关牛生殖周期及其失调的问题提供了有效的手段^[10]。在 B 超扫描图上,卵泡的影像为无回声区和暗区,卵泡壁为强回声、边缘光

滑,由于受相邻卵泡或卵巢组织的挤压,卵泡呈不规则的圆形或椭圆形。不同阶段的黄体结构有所差异,刚排卵后形成的红体回声比成熟黄体弱,常常在其中心区有一个圆形液性暗区,但随黄体进一步发育暗区逐渐缩小以至消失。而成熟黄体有较强的回声,容易分辨^[11]。该试验应用 B 超扫描技术,对超排过程中牦牛卵巢的发育状况进行了全程的跟踪监测,发现大多数个体超排募集起来的优势卵泡可以顺利排卵并形成红体,进一步发育成为黄体,在 B 超图像上表现出典型的强回声黄体区域。而有部分个体优势卵泡不能排卵,而是逐渐闭锁、体积减小,也没有监测到黄体的形成。

参考文献

- [1] 丁爱军,苏雷.哺乳动物卵泡闭锁的研究[J].种业研究,2007,6:34-37.
- [2] CUI Y, YU S J. An anatomical study on the internal-genital organs of the yak at different ages[J]. The Veterinary Journal, 1999, 157: 192-196.
- [3] CUI Y, YU S J. Ovarian morphology and follicular systems in yaks of different age[J]. The Veterinary Journal, 1998, 157: 197-205.
- [4] 张容昶. 中国的牦牛[M]. 兰州:甘肃科学技术出版社, 1989.
- [5] 权凯. 牦牛超排技术的研究[D]. 兰州:甘肃农业大学, 2004.
- [6] 阎萍,梁春年,姚军,等. 高寒放牧条件下牦牛超数排卵试验[J]. 中国草食动物, 2003(3): 9-10.
- [7] 余四九,巨向红,王立斌,等. 天祝白牦牛胚胎移植试验研究[J]. 中国科学(C 辑), 2007(2): 185-189.
- [8] SPICER L J, LEUNG K, CONVEY E M, et al. Association among size and number of ovarian follicle, Uterine involution, and hormones in serum, and follicular fluid[J]. Anim Sci, 1986, 62(3): 734-741.
- [9] LUCY, M C W W, THATCHERAND K L, et al. vitasonic identification of follicular populations and return to estrus in early postpartum dairy cattle-givem intravaginal ongest for 15 day[J]. Theriogenology, 1990, 34: 325-337.
- [10] 赵凯,田文儒,刘焕奇,等. 超声诊断技术在兽医产科上的应用[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2000(9): 39-40.
- [11] 王纯正,徐智章. 超声诊断学[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社, 2002: 5.

(上接第 8605 页)

与细胞增殖的程度成正比。结果显示,3 种多糖组分的 OD 值均高于细胞对照组,表明它们均有促增殖作用,其中 GAP₃₀、GAP₆₀组在 10⁻² mg/ml 剂量差异显著($P < 0.05$), GAP₉₀组在 10⁻³ mg/ml 即表现出显著差异($P < 0.05$),表明 GAP₉₀的抗 CEF 增殖作用效果最好。

3.2 3 种多糖成分均有不同程度的抗 NDV 病毒作用 OD 值不但反映活细胞的多少,也反映细胞的病变程度,间接地反映病毒增殖的程度。细胞被病毒感染破坏或干扰了功能后可降低对中性红的吸收能力,随着病毒在细胞内不断增殖,细胞受到损坏,病变程度逐渐加重,受损细胞数量逐渐增多,OD 值降低。结果显示,所有多糖一病毒组的 OD 值均大于病毒对照组,表明它们有显著的抗病毒作用,以 GAP₉₀的作用最强。

4 结论

GAP₉₀对鸡胚成纤维细胞(CEF)的增殖以及抵抗 NDV 感染作用较为明显,因此该多糖可能为芝芪菌质提高动物免

疫力的有效成分之一,同时该多糖也具备了作为抗 NDV 感染的新型免疫增强剂的应用前景。目前,笔者正在对具有显著促 CEF 增殖和抗 NDV 感染作用的 GAP₉₀多糖组分进行分离纯化,以得到单一组分,并对其理化性质、单糖组成、化学结构和免疫学活性进行进一步研究,以期探寻芝芪菌质多糖的成分结构及其增强动物免疫力的作用机制,为芝芪菌质的深入研究打下基础。

参考文献

- [1] 王泽霖. 正确认识新城疫加强免疫防控[J]. 中国家禽, 2007, 29(9): 1-4.
- [2] 张李阳,周业飞,张敦林. 药用真菌发酵产物对 AA 肉鸡免疫功能及生长的影响[J]. 饲料研究, 2005(1): 44-47.
- [3] 许秀平,周业飞,储瑞华,等. 芝芪菌质增强肉鸡免疫力和促进生长的试验报告[J]. 中国家禽, 2007, 29(15): 57-58.
- [4] 陈玉胜,阮明,张李阳,等. 芝芪菌质水提物活性成分与抗氧化活性研究[J]. 江苏农业科学, 2007(6): 268-270.
- [5] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 2 版. 北京:科学出版社, 1997: 204-246.
- [6] 高英杰,贺玉琢,沈鸿,等. 中性红染料吸收法在抗病毒中药研究中的应用[J]. 中药药理与临床, 1998, 14(4): 45-47.