

猕猴精子优选及体外获能的研究

陈永昌¹ 陈学进² *

(1 中国科学院昆明动物研究所, 昆明, 650223) (2 上海第二医科大学发育生物学研究中心, 上海, 200025)

摘要: 选择活率高的精子并进行体外获能是开展猕猴体外受精研究的必要程序, 是研究猕猴受精生物学的重要手段。本实验采用上浮法和 Percoll 梯度离心法对猕猴精液进行了优选, 并对处理后的精子形态正常率、精子活率、密度及受精率作了比较, 发现二者差异不显著; 用 dbcAMP 和咖啡因使精子获能, 发现只有两种获能剂同时存在才能使猕猴精子获能并使卵母细胞受精。结论为: 上浮法和 Percoll 法都是有效的精子优选法, 对受精率的影响差异不显著; dbcAMP 和咖啡因在猕猴精子体外获能时缺一不可。

关键词: 猕猴; 精子优选; 体外获能

中图分类号: Q954.4

文献标识码: A

文章编号: 1000 - 1050 (2005) 01 - 0073 - 04

Motile Sperm Separation and Sperm Capacitation in Rhesus Monkeys (Macaca mulatta)

CHEN Yongchang¹ CHEN Xuejin² *

(1 Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming, 650223)

(2 Research Centre of Developmental Biology, Shanghai Second Medical University, Shanghai, 200025)

Abstract: Selection of fine quality rhesus monkeys' semen is needed for in vitro fertilization protocol, which is an important method for studying the biology of monkey reproduction. Semen was separated by the swim up and Percoll density gradient centrifugation methods, after which intact sperm rate, motility rate, concentration of sperm and fertility rate showed no great differences. Caffeine and dbcAMP were used during sperm capacitation, the result showed that rhesus oocyte can be fertilized when both caffeine and dbcAMP are added. The conclusion is that both caffeine and dbcAMP are necessary for inducing sperm capacitation, which affects the ability of sperm to bind to the zona and to undergo the acrosome reaction.

Key words: Rhesus monkey (*Macaca mulatta*); Motile sperm separation; In vitro capacitation

体外受精技术已经在很多物种上获得成功, 1984 年体外受精的猕猴就已经成功诞生 (Bavister *et al.*, 1984), 但猕猴体外受精及胚胎移植的难度较其它动物更大, 我国至今还没有体外受精猕猴出生的报道, 其中猕猴体外受精胚胎的发育阶段与受体猕猴子宫环境同期化程度的把握、猕猴精液处理等都是有待进一步深入研究的课题。目前, 有关猕猴超数排卵及卵母细胞体外成熟的研究已经比较深入, 但猕猴精液的采集、冷冻保存等都存在一定困难, 所以如何有效地利用有限的猕猴精液, 以提高猕猴体外受精成功率就显得十分重要。本文采用常用的精液优选方法对用于体外受精的猕猴精液进行

预处理, 以提高精子的活力, 同时将分别对猕猴精子获能剂 dbcAMP 和咖啡因的具体作用进行探索性研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物

上海动物园提供的 15 只健康成年、具有规律性月经周期的未孕雌性猕猴, 这些猕猴经超数排卵处理后得到试验用卵母细胞; 5 只成年健康雄性猕猴, 供精液采集用。实验猕猴单笼饲养半年以上, 给予规律的光照周期, 室内温度保持在 20 左右。每天饲喂 2 次, 食物以玉米饼、馒头为主食, 辅

作者简介: 陈永昌 (1976 -), 男, 硕士, 从事动物胚胎工程研究与开发, E-mail: cyc315@163.com

收稿日期: 2004 - 02 - 03; 修回日期: 2004 - 07 - 19

* 通讯作者, correspondence author; E-mail: chenxuej@yahoo.com.cn

蔬菜、水果等，自由饮水。

1.2 实验用品

CO₂培养箱、离心机、水浴锅、体视显微镜、各种实验用试管耗材等。培养液包括精子洗涤液 (TALP - Hepes)、Percoll 液、精子悬浮液 (TALP - Hepes + 0.3 %BSA, pH7.4)、精子获能液 (TALP + 2 mmol/L dbcAMP 或 2 mmol/L 咖啡因或 1 mmol/L dbcAMP + 1 mmol/L 咖啡因)、受精液 (TALP - Hepes + 0.3 %BSA, pH7.4) 等。

1.3 精子优选

采用陈永昌等 (2003) 方法，采集精液并液化处理，用上浮法或 Percoll 密度梯度离心法优选精子，用血细胞计数器测算精子密度。用预平衡的 TALP 液将精子密度稀释至 2 ×10⁷个/ml，在 35 mm 培养皿中做成 3 ml 的液滴，上面覆盖无菌石蜡油，37°C 的 CO₂培养箱中孵育 5 ~ 8 h。

1.4 精子获能处理

在孵育的最后 1 ~ 1.5 h 向精子悬浮液中加入 2 mmol/L dbcAMP 或 2 mmol/L 咖啡因或 1 mmol/L db-

cAMP + 1 mmol/L 咖啡因，促进精子获能。

1.5 体外受精

将超数排卵 (陈学进等, 2003) 获得的卵母细胞进行体外成熟处理，并与获能后的精子体外受精。用受精率及处理后精子的运动状态评价精子获能效果。

1.6 统计分析

精液预处理前后评定精子活率，观察精子形态正常率，测评精子密度，获能处理后观察精子的运动状态，体外受精后统计受精率。实验均重复 3 次，用 χ^2 检验进行分析。

2 结果

2.1 预处理前后精液品质比较

将采集的精液液化处理后，对活率高于 70 % 的液化部分进行洗涤优选，处理后体积保持不变，测定优选后的精子形态正常率、活率和密度，将密度调整为 2 ×10⁵个/ml 或 2 ×10⁶个/ml，并对成熟卵母细胞授精，统计受精率。结果见表 1。

表 1 两种精子优选法对猕猴体外受精结果的影响

Table 1 Effect of two sperm motile separation methods on IVF in rhesus monkeys

处理方法 Method of treatment	重复次数 No. Replications	精子形态正常率 (%) Intact sperm rate (%)	精子活率 (%) Motility rate (%)	精子密度 (×10 ⁸ 个/ml) Concentration of sperm (%)	受精率 (%) Fertility rate (%)
处理前 Before treatment	3	68 ±10 ^A	72 ±11 ^A	3.5 ±0.6 ^A	—
上浮法 Swim up	3	82 ±7 ^B	85 ±6 ^B	1.4 ±0.3 ^{ab}	57 ±9 ^a
Percoll 法 Percoll	3	84 ±6 ^B	83 ±9 ^B	2.1 ±0.5 ^{ab}	61 ±6 ^a

同一列中，不同大写字母上标为差异极显著 ($P < 0.01$)，不同小写字母上标为差异显著 ($P < 0.05$)，相同字母上标为差异不显著 ($P > 0.05$)。

Value in the same column with different capital superscripts show great significant difference ($P < 0.01$)，different small superscripts show significant difference ($P < 0.05$)，same superscripts show no statistical difference ($P > 0.05$) 。

2.2 化学试剂对猕猴精子获能的作用

在孵育的最后 1 ~ 1.5 h 向精液悬浮液中加入 2 mmol/L dbcAMP 或 2 mmol/L 咖啡因或 1 mmol/L db-cAMP + 1 mmol/L 咖啡因，以促进精子获能，然后

对成熟卵母细胞进行体外受精。授精密度为 5 ×10⁴ 个/ml、2 ×10⁵个/ml 或 2 ×10⁶个/ml，观察精子运动方式，授精后 18 ~ 24 h 统计受精率，结果见表 2。

表 2 dbcAMP 和咖啡因使猕猴精子获能的比较
Table 2 Effect of Caffeine and dbcAMP on sperm capacitation in rhesus monkeys

获能剂 Capacitation factor	实验次数 No. Replications	精子运动状态 Sperm motility	卵母细胞数 No. Oocytes	获能剂浓度 Con. Capacitation factor (mmol/L)	受精率 (%) Fertility rate
咖啡因 Caffeine	3	附着到透明带 Bind to the zone	15	2	0 ^A
DbcAMP	3	活力增强，混乱 Active but mass	15	2	0 ^A
咖啡因 + dbcAMP Caffeine + dbcAMP	3	超激活状态 Superactivation	86	1	58 ±6 ^B

同一列中，不同字母上标为差异极显著 ($P < 0.01$)
Value in the same column with different superscripts show great significant difference ($P < 0.01$)

3 分析与讨论

3.1 精子优选方法对猕猴体外受精结果的影响

体外受精必须具备的两个基本条件是成熟的卵母细胞和高活率、一定密度的优质精子。猕猴精液具有射出后很快凝结成块的特性，经过物理或化学方法能使部分凝块液化，但经过这些处理后得到的精液质量不稳定。为了彻底去除精清和杂质，优选高品质的精液进行授精，一般采用上浮法或 Percoll 法。从表 1 结果可以看出，两种精子优选法均能明显提高猕猴精子形态正常率和精子活率，精子密度明显下降，上浮法下降更显著，但都能够满足体外受精用，两种方法受精率差异不显著 ($P > 0.05$)。对人的研究发现 (黄敏珍等, 2002)，两种方法优选的精子对受精率、卵裂率和着床前胚胎发育状况的影响均无显著差异，但临床妊娠率和婴儿出生率 Percoll 法明显高于上浮法，但这一现象在猕猴中还未见报道，由于体外受精猕猴数量太少，还不足以说明问题。

3.2 dbcAMP 和咖啡因对猕猴精子获能的作用

精子获能是体外受精必须经历的生理过程，通过获能，可以去除精子表面附着的抗原物质和去能因子，引起精子细胞膜糖蛋白变化，即发生顶体反应。从外观上看，获能后的精子运动方式会出现显著变化，由直线前进变为曲线运动，即出现超激活的运动状态，使顶体内形成小泡，并引起顶体内数种酶的激活和释放，它是精子穿过透明带的前提条件。上浮法和 Percoll 密度梯度离心法已经分离出了高活率的精子，但为了使精子出现超激活状态，

常常添加一些化学试剂来刺激精子活力并保持之 (陈大元, 2000)。常用的精子获能方法有肝素处理法、离子载体法、咖啡因处理法及添加卵泡液、子宫液、输卵管液等方法 (郭志勤, 1998)。在有关猕猴精子获能的研究中，基本都采用咖啡因和 dbcAMP 结合作为精子获能剂，尚未见到仅用其中一种成分使猕猴精子获能并进一步受精的报道。表 2 结果表明，单独使用咖啡因或 dbcAMP，分别会引起精子的运动方式呈一定附着性或使其活力增强，只有二者结合使用才可引起精子出现超激活的运动状态，受精率为 58 % 左右，而单独使用任何一种获能剂均不能使卵母细胞受精。咖啡因主要是通过抑制磷酸二酯酶而导致胞内 cAMP 的积累。Pomeroy 等 (1988) 的研究发现，咖啡因可以提高小鼠精子顶体反应、精子结合透明带的能力以及精—卵膜的融合能力。dbcAMP 由于给精子提供了能量，使精子尾动能能力增强，从而使精子活动能力明显提高，进一步引起了顶体反应。糖和其他能量物质可使精子存活时间延长，活率增加 (Chan *et al.*, 1982; Mahony *et al.*, 1996; Vandewoort *et al.*, 1994, 1995)，但只有在咖啡因和 dbcAMP 共同使用时才可引起精子发生顶体反应，使卵母细胞受精。原因是虽然咖啡因和 dbcAMP 都使细胞内 cAMP 的水平升高 (陈大元, 2000)，但咖啡因主要影响精子对卵母细胞的附着性，而 dbcAMP 可引起顶体反应。各种动物精子附着于透明带时其顶体是否已经起反应不完全一样。小鼠只有顶体完整的精子才能附着于透明带，其精子顶体反应在附着后才发生，而豚鼠只有顶体反应的精子才能附着于透明带，仓鼠则无

论是顶体反应已发生还是完整的精子，均可附着于透明带。我们还不能确定猕猴精子先附着于透明带还是先发生顶体反应，但可以肯定，只有二种获能剂共同作用才可使猕猴精子获能。

致谢：本研究中实验动物由上海动物园提供，向对本文做出一定帮助的陈丽华院长表示感谢，也感谢对文章修改提出宝贵意见的甘肃农业大学崔泰保教授。

参考文献：

- Bavister B D, Boatman D E, Collins K. 1984. Birth of rhesus monkey infant after invitro fertilization and nonsurgical embryo transfer. *Proc Natl Acad Sci*, **81**: 2218 - 2222.
- Chan P J, Hutz R J, Dukelow W R. 1982. Nonhuman primate in vitro fertilization: seasonality, cumulus cells, cyclic nucleotides, ribonucleic acid, and viability assays. *Fertil Steril*, **38** (5): 609 - 615.
- Mahony M C, Landendorf S, Gordon K. 1996. Effects of caffeine and dbcAMP on zona pellucida penetration by epididymal spermatozoa of cynomolgus monkeys. *Mol Reprod Dev*, **43** (4): 530 - 535.
- Pomeroy K O, Dodds J F, Seidel G E Jr. 1988. Caffeine promotes in vitro fertilization of mouse ova within 15 minutes. *J Exp Zool*, **284**: 207 - 212.
- Vandevoort C A, Tollner T L, Overstreet J W. 1994. Separate effects of caffeine and dbcAMP on macaque sperm motility and interaction with the zona pellucida. *Mol Reprod Dev*, **37** (3): 299 - 304.
- Vandevoort C A, Overstreet J W. 1995. Effects of glucose and other energy substrates on the hyperactivated motility of macaque sperm and the zona pellucida-induced acrosome reaction. *J androl*, **16** (4): 327 - 333.
- 陈大元. 2000. 受精生物学：受精机制与生殖工程. 北京：科学出版社.
- 陈学进, 陈永昌, 陈丽华, 郭宪. 2003. 用兽用性腺激素超排猕猴的研究. 草食家畜 (增刊), 88 - 91.
- 陈永昌, 陈学进, 陈丽华, 郭宪. 2003. 猕猴精液采集及其品质分析. 草食家畜 (增刊), 198 - 201.
- 郭志勤. 1998. 家畜胚胎工程. 北京：中国科学技术出版社.
- 黄敏珍, 邢福祺, 陈士岭, 朱伟杰. 2002. 两种活动精子分离法的体外受精结局比较. 生殖与避孕, **22** (5): 292 - 294.