

## 影响牦牛卵母细胞体外成熟的因素分析

郭韶珂<sup>1</sup>, 裴 杰<sup>1</sup>, 宋仁德<sup>2</sup>, 李吉叶<sup>3</sup>, 包鹏甲<sup>1</sup>, 梁春年<sup>1</sup>, 郭 宪<sup>1\*</sup>

(1. 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所, 甘肃省牦牛繁育工程重点实验室, 兰州 730050;

2. 玉树州动物疫病预防控制中心, 青海 玉树 815099; 3. 青海省大通种牛场, 西宁 810102)

**摘 要:**牦牛是青藏高原地区的重要畜种, 为牧民提供生产和生活资料。但是牦牛的繁殖力较低, 通常为 2 年 1 胎或 3 年 2 胎, 选育改良进展缓慢。卵母细胞体外成熟培养作为体外受精和胚胎发育必不可少的步骤, 已被应用于牦牛科学研究和繁殖生产上。由于牦牛卵母细胞体外成熟能力远远低于体内, 因此完善体外培养条件, 提高牦牛卵母细胞体外培养的成熟率, 对牦牛繁育技术研发和育种生产都有重要的意义。本文从卵巢保存、卵母细胞采集、卵母细胞培养、培养基添加剂等方面对卵母细胞体外成熟的影响因素进行了分析, 旨在提高卵母细胞体外成熟发育质量, 为牦牛体外受精技术提供技术参考。

**关键词:** 牦牛; 卵母细胞; 体外成熟

中图分类号: S823.8<sup>+</sup>5

文献标识码: A

文章编号: 1001-9111(2021)01-0043-05

牦牛(*Bos grunniens*)为青藏高原及其附近高海拔地区藏族牧民提供肉类和其他生活必需品, 是当地畜牧产业经济的重要来源。由于生存环境和饲养管理等条件的限制, 牦牛繁殖力较低<sup>[1]</sup>, 一般是隔年产犊, 2 年 1 胎或 3 年 2 胎, 因世代间隔长而导致牦牛选育改良进展缓慢。为了提高牦牛繁殖效率, 在短时间内获得大量卵母细胞, 从屠宰母牦牛卵巢的卵泡内抽吸卵母细胞进行体外成熟培养的技术已成为牦牛繁殖研究的热点。卵母细胞的生长发育、减数分裂的恢复和最后成熟是一个受多种蛋白质和信号通路调控的复杂过程, 尽管研究人员尝试不断改善体外成熟卵母细胞的培养体系, 体外成熟卵母细胞的活力仍低于体内成熟的卵母细胞<sup>[2]</sup>, 卵母细胞体外成熟效率低和胚胎质量差限制了体外受精和体外胚胎培养的发展<sup>[3]</sup>。本文总结了近年来关于牦牛卵母细胞体外培养(*in vitro maturation*, IVM)的方法和进展, 分析了不同因素对牦牛卵母细胞体外成熟的影响, 为后续更好地进行牦牛卵母细胞体外培养, 提高牦牛卵母细胞体外培养的成熟率提供理论基础和参考。

### 1 卵巢保存

卵巢保存是获取高质量卵母细胞的重要前提。

从屠宰场采集的卵巢应立即保存在含有双抗的生理盐水中, 并运往实验室进行卵母细胞收集, 这一过程的时间最好控制在 2 h 之内, 因地域等条件的限制, 最晚也不超过 6 h。防止卵巢因离体时间过长出现而细胞代谢障碍, 卵母细胞活力会随着缺氧和毒性物质的积累而降低<sup>[4]</sup>。卵巢的保存温度一般都在 25~37℃, 而在不同品种上会稍有不同。牛卵巢保存温度在 30~35℃左右, 比山羊和绵羊的卵巢保存温度略高一些。郭宪等<sup>[5]</sup>通过研究白牦牛卵巢不同的保存温度对其后续细胞培养的影响, 发现使其卵母细胞成熟率、卵裂率达到最高的保存温度为 30~38℃。保存温度过高和过低会使卵母细胞出现冷休克和热应激, 都会影响卵母细胞的成熟及后续胚胎发育的质量。

### 2 卵母细胞采集

#### 2.1 卵母细胞来源

来源于不同卵泡类型和形态的卵母细胞的质量和成熟率也会有不同。刘犇<sup>[6]</sup>发现来自初情期前犊牛的卵母细胞受精之后胚胎发育的囊胚率明显低于来自成年牦牛的卵母细胞, 不过这两种来源卵母细胞受精后胚胎发育的卵裂率并无显著不同。阎萍等发现与来自黄体期卵母细胞相比, 卵泡期卵母细

收稿日期: 2020-09-11 修回日期: 2020-09-20

基金项目: 现代农业(肉牛牦牛)产业技术体系建设专项(CARS-37); 科技援青合作专项(2020-QY-212, 2020-QY-218); 中国农业科学院创新工程项目(CAAS-ASTIP-2014-LIHPS-01)

作者简介: 郭韶珂(1998—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事牦牛繁殖与育种研究。

\* 通讯作者: 郭宪(1978—), 男, 研究员, 博导, 主要从事动物遗传育种/动物繁育原理与技术研究。

胞体外成熟率明显升高<sup>[7]</sup>,同时发现来自卵巢表面的卵母细胞的成熟率和卵裂率都要显著高于来自卵巢内的卵母细胞<sup>[8]</sup>。李天强等<sup>[4]</sup>比较了不同类型的卵泡后发现与小卵泡、大卵泡和充血卵泡相比,中等卵泡内获得的可用的卵丘—卵母细胞复合体(cumulus-oocyte complex, COCs)的数量较多,从中抽取的卵母细胞的成熟率也较高。Kanwichai 等<sup>[9]</sup>分别采集了凉爽(1—2月)、夏季(3—4月)和雨季(5—6月)的牛卵巢,发现在夏季采集的卵巢中可获得的COCs数量最高、质量最好,不过不同季节来源对卵母细胞的成熟率无影响。在进行体外培养时,可根据后续实验需求选择不同来源的卵母细胞。

## 2.2 卵母细胞采集方法

从卵巢表面卵泡内采集卵母细胞的方法不同,对卵巢的利用率也有差别。抽吸法和切割法是从卵巢中获得卵母细胞最常用的方法,选择不同方法得到的卵母细胞的成熟率是没有明显不同的。抽吸法相对于切割法来说操作更简便、快速,但容易损伤卵丘细胞,影响卵母细胞质量,回收率不如切割法<sup>[5]</sup>。为了弥补这两个方法的不足,阎萍等<sup>[8]</sup>结合了抽吸法和切割法,发现从牦牛卵巢中获得的COCs数量显著增加,获得的可用卵母细胞数有4~5个,但后期卵母细胞体外培养的成熟率却不如抽吸法。Hamano 等<sup>[10]</sup>则用自己制作的特殊的一种刀切割牛卵巢,得到的卵母细胞数量是抽吸法的3~4倍,质量也相对更高。

## 2.3 卵丘细胞层数

根据王玉恒等<sup>[11]</sup>的牦牛卵母细胞等级的判定标准,将牦牛COCs分为四级:A级卵母细胞为有3层及以上的卵丘细胞层紧密围绕在外围,胞质颜色浅、分布均匀;B级卵母细胞为卵丘细胞层数减少,有2~3层的卵丘细胞层包裹,胞质和色泽变化不大;C级卵母细胞为几乎没有外围的卵丘细胞层,胞质中有黑色颗粒物出现,分布不均匀;D级卵母细胞为发生退化的或变形的卵母细胞。孙永刚等<sup>[12]</sup>也按照了上述方法对COCs进行分级后分别培养,结果表明A级COCs无论是成熟率还是卵裂率和囊胚率都是最高的。这说明卵丘细胞的层数会对卵母细胞体外成熟效果和胚胎的发育程度产生重要的影响。

## 3 卵母细胞培养

### 3.1 培养时间和温度

牛卵母细胞的卵裂率和囊胚率会受到体外培养时间和温度的影响。陈生梅等<sup>[13]</sup>通过对比不同体外培养时间后卵母细胞的成熟率,发现牦牛卵母细

胞体外培养16h的效果最差,培养时间应大于20h。孙永刚等<sup>[12]</sup>研究发现第一极体的排出率会随着体外培养时间的延长而增加,培养24h是最宜进行体外受精的时长。因此,牦牛卵母细胞体外培养时间大多为24~26h。牛卵母细胞的体外成熟的培养温度大多为38~39℃,因为这个温度和牛的直肠温度相近,但多数实验证明牦牛卵母细胞的体外培养的最佳温度为38.5℃。

### 3.2 培养方式

庞礴等<sup>[14]</sup>选择了4孔板和35mm培养皿分别培养牦牛COCs,对比两者的卵母细胞成熟率,虽然得到的结果差异并不显著,但是经四孔板培养的卵母细胞成熟率略高一点。因此为了提高牦牛卵母细胞的成熟率,可以考虑适当地将卵母细胞分散开来,进行体外培养。

### 3.3 培养环境中氧浓度

培养环境在卵母细胞体外培养过程中是一个不可忽视的因素。尤其是氧浓度,对卵母细胞和早期胚胎的发育能力产生一定的影响<sup>[15]</sup>。He 等<sup>[16]</sup>发现氧浓度为5%时可以提高牦牛卵母细胞的成熟率和牦牛早期胚胎的发育能力,但胚胎的卵裂率有所降低。推测可能是在体外培养过程中改变了相关基因的表达,抑制了细胞凋亡。

## 4 培养基添加剂

### 4.1 血清

胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)被广泛应用于牛卵母细胞体外培养。血清中含有许多的营养物质,可以为卵母细胞提供所需的激素、蛋白质和生化因子等。国内外大多数实验室FBS的添加量均为10%~20%。何俊峰等<sup>[17]</sup>的实验结果表明,在牦牛卵母细胞体外成熟过程中10%FBS的添加量是最佳的。

### 4.2 卵泡液

牛卵泡液(bovine follicular fluid, BFF)中含有蛋白质、细胞因子、生长因子、类固醇、代谢物和其他未知因子<sup>[18]</sup>。一些作者已经发现在成熟培养液中添加BFF对卵母细胞的发育潜力具有与血清相当的有利影响<sup>[19]</sup>。Lopes 等<sup>[20]</sup>研究发现BFF与标准的IVM补充(FBS)相比,具有更高的卵丘扩张率,更快的胚胎发育速度,以及更多的每个胚胎的细胞数量。灭活BFF会降低体外受精效率,但不会影响囊胚的发育和质量。BFF中含有的来自血清的生化因子和由颗粒细胞等分泌的各种成分,可以促进卵母细胞的胞质成熟和核成熟。Kim 等人<sup>[21]</sup>发现低浓度的BFF导致囊胚中的细胞数量增加,而高浓度的BFF

降低了囊胚的发育率,这表明高浓度的 BFF 可能对减数分裂有抑制作用。何俊峰等<sup>[17]</sup>研究发现牦牛卵母细胞体外培养过程中的 BFF 添加量为 20% 为宜,当添加量为 30% 时,会抑制卵母细胞的发育。

#### 4.3 表皮生长因子

表皮生长因子 (epidermal augmentum factor, EGF) 被认为是促进卵母细胞成熟的主要生长因子之一,是 COCs 中促性腺激素信号放大的主要因素<sup>[22]</sup>。在体内,EGF 信号随着时间的推移被迅速放大和维持,以促进和传播促性腺激素,这对排卵是必不可少的<sup>[23]</sup>。而且,已知由卵丘细胞产生的透明质酸 (hyaluronic acid, HA) 负责卵母细胞成熟期间卵丘细胞的正常功能。Ríos 等<sup>[24]</sup>研究表明,在体外成熟培养液中联合添加 EGF - HA 可以提高卵母细胞的减数分裂能力,并保证较好的发育到囊胚的时机。潘阳等<sup>[25]</sup>认为在培养液中添加 100 ng/mL EGF 可以明显提高牦牛卵母细胞成熟率,这可能跟 EGF 调控细胞凋亡相关基因的表达有关。

#### 4.4 激素

在卵泡发育过程中,在排卵前促性腺激素释放诱导卵母细胞核和细胞质成熟<sup>[26]</sup>。因此,大多数物种的体外培养体系经常出现在体外成熟培养基中添加促性腺激素如促卵泡素 (Follicle-Stimulating Hormone, FSH) 和促黄体生成素 (Luteinizing Hormone, LH) 来诱导卵丘细胞扩张、核成熟、细胞质分化。FSH 主要刺激颗粒细胞和卵丘细胞的增殖和分化,以及代谢和类固醇生成活动<sup>[27]</sup>,由于牦牛卵母细胞卵丘细胞的 FSH 受体水平高于 LH 受体水平,FSH 比 LH 更有效。FSH 和 LH 的适宜添加比例需研究来证明。当 FSH 和 LH 的浓度分别为 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 50 IU/mL 时的卵裂率和囊胚发育率均最高<sup>[28]</sup>。Ali 等<sup>[29]</sup>通过 FSH 组和添加胎牛血清的对照组相比,发现在卵母细胞体外成熟的最初 6 h 添加 FSH 可以显著提高胚胎发育率。另一项研究表明,与未刺激的 (无 FSH) 复合体相比,FSH 可显著增大卵母细胞-卵丘复合体的直径,并刺激成熟 20 ~ 24 h 的葡萄糖消耗<sup>[30]</sup>。

#### 4.5 微量元素

在卵母细胞的培养液中添加锌和铜可以影响卵丘细胞内谷胱甘肽的含量,维持卵丘细胞 DNA 完整性,进而促进早期胚胎发育。在牛卵母细胞体外培养液中,当添加锌浓度为 1.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,添加铜浓度为 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,卵丘细胞 DNA 损伤明显减轻<sup>[31-32]</sup>,囊胚发育率显著提高<sup>[33]</sup>。锌的抗氧化作用可能是通过防止卵丘细胞 DNA 氧化损伤来维持卵丘-卵母细胞复合体 DNA

完整性的重要机制<sup>[34]</sup>。胡嘉嘉<sup>[35]</sup>发现在体外培养体系中锌的添加可以通过调节细胞内 GSH、ROS 和 SOD 水平和相关转运基因的表达来改善牦牛卵母细胞和胚胎的发育潜力。

#### 4.6 谷胱甘肽

谷胱甘肽 (Glutathione, R - Glutamyl Cysteingl + Glycine, GSH) 是哺乳动物细胞中最普遍的硫醇化合物,在保护细胞免受氧化损伤方面起着至关重要的作用,可以促进卵母细胞体外成熟和胚胎发育进程。参与谷胱甘肽合成的组成氨基酸有甘氨酸 (Glycine, Gly)、谷氨酸 (Glutamic Acid, Glu) 和半胱氨酸 (L - Cysteine, Cys)。卵母细胞内还原型谷胱甘肽水平被认为是卵质成熟的指标,GSH 含量高的卵母细胞具有较好的发育潜力。Furnusa 等<sup>[36]</sup>研究发现当半胱氨酸单独存在于 IVM 培养液中或与 Glu 和 Gly 一起使用时,不仅提高了 GSH 含量,而且对卵裂率、桑椹胚发育率和囊胚发育率也有有利的影响。

#### 4.7 cAMP

在哺乳动物卵母细胞中,cAMP (Cyclic Adenosine monophosphate,腺苷 3',5' - 环化一磷酸) 在维持卵母细胞减数分裂停滞和启动减数分裂恢复的进程中起着关键作用。在体外成熟过程中人工诱导 cAMP 水平可以显著提高卵母细胞的发育能力。从广义上讲,有两种方法可用于维持 IVM 期间的 cAMP 水平。第一种方法在 IVM 期间使用特定或非特异的 PDE 抑制剂,如 3 - 异丁基 - 1 - 甲基黄嘌呤 (IBMX) 和西洛他唑 (Cilostazol),以防止 cAMP 降解<sup>[37]</sup>。另一种方法模拟生理性卵母细胞成熟,用 Forskolin 等药剂预处理 COCs 1 ~ 2 h,以维持较高的 COC cAMP 水平<sup>[38]</sup>。cAMP 调节剂可以可逆地影响牦牛未成熟卵母细胞的减数分裂进程。相反,在体外成熟前用西洛他唑处理牦牛卵母细胞,可能通过提高卵母细胞内 cAMP 和 GSH 水平,调节 mRNA 的表达模式,对牦牛卵母细胞的发育能力产生积极的影响<sup>[39]</sup>。

## 5 展望

牦牛卵母细胞 IVM 主要集中在对卵母细胞体外培养物理条件的探究和培养液中添加剂成分和比例的研究,以寻找牦牛卵母细胞体外成熟的最佳条件。总结前人的培养方法,牦牛卵母细胞在 38.5  $^{\circ}\text{C}$ ,5%  $\text{CO}_2$  浓度、饱和湿度条件下培养 24 h 为宜。培养液中胎牛血清、卵泡液、促卵泡素、无机盐、生长因子的添加都是必不可少的,各添加剂的含量和比例也会对卵母细胞卵裂及后期发育产生影响。除了对卵母细胞成熟条件的研究,卵母细胞的超低温保

存已成为一项必不可少的育种辅助技术。近年来涌现出各种可用于哺乳动物胚胎和卵母细胞冷冻的新技术,其中玻璃化冷冻和传统的慢速冷冻法相比具有细胞内冰晶形成的机率低,冷冻效率高,且操作简易等优点<sup>[40]</sup>。但是未成熟阶段冷冻保存的卵母细胞在成熟、受精和胚胎发育的能力有明显下降<sup>[41]</sup>,可能是跟高浓度冷冻保护剂对细胞的强毒性和细胞结构的损伤有关。为了降低冷冻保存对卵母细胞的损伤,在培养液中添加 IGF-1<sup>[42]</sup>、甲基-β-环糊精(MβCD)<sup>[43]</sup>、L-肉碱(LC)和白藜芦醇(R)<sup>[44]</sup>来提高卵母细胞冷冻保存的耐受性。因此,将卵母细胞冷冻保存与体外成熟培养相结合,对于提高玻璃化卵母细胞的存活率和后续发育能力具有重要意义,也是未来研究的方向。

### 参考文献:

- [1] SARKAR M, MEYER H H D, PRAKASH B S. Is the yak (*Poephagus grunniens* L.) really a seasonal breeder[J]. *Theriogenology*, 2006, 65(4): 729.
- [2] GREMEAU A S, ANDREADIS N, FATUM M, et al. In vitro maturation or in vitro fertilization for women with polycystic ovaries: A case-control study of 194 treatment cycles[J]. *Fertility & Sterility*, 2012, 98(2): 358-359.
- [3] SMITZ J E, THOMPSON J G, GILCHRIST R B. The promise of in vitro maturation in assisted reproduction and fertility preservation [J]. *Seminars in Reproductive Medicine*, 2011, 29(1): 25.
- [4] 李天强. 天祝白牦牛卵母细胞体外成熟的研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2008.
- [5] 郭宪, 阎萍, 许保增, 等. 白牦牛卵母细胞的采集方法及卵巢贮存条件对其体外成熟的影响[J]. *畜牧兽医杂志*, 2006, 25(6): 14.
- [6] 刘森. 牦牛体外胚胎生产条件优化与凋亡分析[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2013.
- [7] 阎萍, 郭宪, 许保增, 等. 白牦牛卵母细胞体外成熟的研究[J]. *中国草食动物*, 2006, 26(4): 8.
- [8] 阎萍, 许保增, 郭宪, 等. 牦牛卵母细胞体外培养成熟条件的建立[J]. *畜牧与兽医*, 2006, 38(1): 15-16.
- [9] KANWICHAI S, PANASOPHONKUL S, VOS P, et al. In vitro maturation of class I oocytes of bovine during different tropical seasons[J]. *Trop Anim. Health Prod.*, 2019, 51(5): 1279.
- [10] HAMANO S, KUWAYAMA M. In vitro fertilization and development of bovine oocytes recovered from the ovaries of individual donors: A comparison between the cutting and aspiration method [J]. *Theriogenology*, 1993, 39(3): 703.
- [11] 王玉恒, 索朗斯珠, 贡嘎, 等. 西藏林芝牦牛卵母细胞体外成熟培养[J]. *高原农业*, 2018, 2(1): 42.
- [12] 孙永刚, 徐惊涛, 才让东智, 等. 牦牛卵母细胞的体外成熟、种间受精与胚胎培养[J]. *畜牧与兽医*, 2012, 44(6): 55-56.
- [13] 陈生梅, 孙永刚, 徐惊涛. 牦牛、黄牛卵巢卵母细胞体外成熟培养的比较研究[J]. *家畜生态学报*, 2014, 35(7): 55.
- [14] 庞礴, 赵新全, 郭志林, 等. 保存温度对卵母细胞体外成熟率的影响及牦牛卵母细胞体外成熟培养方式初探[J]. *新疆农业科学*, 2012, 49(6): 1160-1161.
- [15] BERMEJO-ALVAREZ P, LONERGAN P, RIZOS D, et al. Low oxygen tension during IVM improves bovine oocyte competence and enhances anaerobic glycolysis[J]. *Reproductive Biomedicine Online*, 2010, 20(3): 342.
- [16] HE H, ZHANG H, LI Q, et al. Low oxygen concentrations improve yak oocyte maturation and enhance the developmental competence of preimplantation embryos[J]. *Theriogenology*, 2020, 156: 46.
- [17] 何俊峰, 崔燕, 余四九. 牦牛卵母细胞体外成熟和体外受精的研究[C]//中国畜牧兽医学会. 中国畜牧兽医学会2008年学术年会暨第六届全国畜牧兽医青年科技工作者学术研讨会论文集. 广州: 中国畜牧兽医学会, 2008: 487-488.
- [18] SUTTON M L, GILCHRIST R B, THOMPSON J G. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity[J]. *Human Reproduction Update*, 2003, 9(1): 36.
- [19] ROMERO-ARREDONDO A, SEIDEL Jr G E. Effects of follicular fluid during in vitro maturation of bovine oocytes on in vitro fertilization and early embryonic development[J]. *Biology of Reproduction*, 1996, 55(5): 1014-1015.
- [20] LOPES J S, CANHA-GOUVEIA A, PARÍS-OLLER E, et al. Supplementation of bovine follicular fluid during in vitro maturation increases oocyte cumulus expansion, blastocyst developmental kinetics, and blastocyst cell number [J]. *Theriogenology*, 2019, 126: 222.
- [21] KIM K, MITSUMIZO N, FUJITA K, et al. The effects of follicular fluid on in vitro maturation, oocyte fertilization and the development of bovine embryos [J]. *Theriogenology*, 1996, 45(4): 795-796.
- [22] CONTI M. Signaling networks in somatic cells and oocytes activated during ovulation [J]. *Annales d'Endocrinologie*, 2010, 71(3): 190.
- [23] HSIEH M, THAO K, CONTI M. Genetic dissection of epidermal growth factor receptor signaling during luteinizing hormone-induced oocyte maturation[J]. *PLoS One*, 2011, 6(6): e21574.
- [24] RIÓS G L, BUSCHIAZZO J, MUCCI N C, et al. Combined epidermal growth factor and hyaluronic acid supplementation of in vitro maturation medium and its impact on bovine oocyte proteome and competence[J]. *Theriogenology*, 2015, 83(5): 879.
- [25] 潘阳阳, 李秦, 崔燕, 等. EGF、EGFR 在牦牛卵母细胞中的表达及对胚胎发育能力的作用[J]. *中国农业科学*, 2015, 48(12): 2439.
- [26] EPPIG J J. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals [J]. *Reproduction, Fertility, and Development*, 1996, 8(4): 485.
- [27] DIAS J A, MAHALE S D, NECHAMEN C A, et al. Emerging roles for the FSH receptor adapter protein APPL1 and overlap of a putative 14-3-3 $\tau$  interaction domain with a canonical G-protein interaction site[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2010, 329(1/2): 19.
- [28] XIAO X, ZI X D, NIU H R, et al. Effect of addition of FSH, LH and proteasome inhibitor MG132 to in vitro maturation medium on the developmental competence of yak (*Bos grunniens*) oo-

- cytes[J]. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2014, 12 (1): 30.
- [29] ALI A, SIRARD M A. Protein kinases influence bovine oocyte competence during short-term treatment with recombinant human follicle stimulating hormone[J]. *Reproduction*, 2005, 130(3): 303.
- [30] SUTTON-MCDOWALL M L, GILCHRIST R B, THOMPSON J G. Cumulus expansion and glucose utilisation by bovine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation; The influence of glucosamine and follicle-stimulating hormone [J]. *Reproduction*, 2004, 128(3): 313.
- [31] PICCO S J, ANCHORDOQUY J M, MATOS D G, et al. Effect of increasing zinc sulphate concentration during in vitro maturation of bovine oocytes [J]. *Theriogenology*, 2010, 74 (7): 1141.
- [32] PICCO S J, ROSA D E, ANCHORDOQUY J P, et al. Effects of copper sulphate concentrations during in vitro maturation of bovine oocytes[J]. *Theriogenology*, 2012, 77(2): 379.
- [33] GAO G, YI J, ZHANG M, et al. Effects of iron and copper in culture medium on bovine oocyte maturation, preimplantation embryo development, and apoptosis of blastocysts in vitro[J]. *Journal of Reproduction and Development*, 2007, 53(4): 783.
- [34] HO E. Zinc deficiency, DNA damage and cancer risk[J]. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2004, 15(10): 573.
- [35] 胡嘉嘉. 锌对牦牛卵母细胞减数分裂成熟及其发育的影响[D]. 成都:西南民族大学,2017.
- [36] FURNUS C C, MATOS D G D, PICCO S, et al. Metabolic requirements associated with GSH synthesis during in vitro maturation of cattle oocytes[J]. *Animal Reproduction Science*, 2008, 109(1/4): 96.
- [37] LI H J, SUTTON-MCDOWALL M L, WANG X, et al. Extending prematuration with cAMP modulators enhances the cumulus contribution to oocyte antioxidant defence and oocyte quality via gap junctions[J]. *Human Reproduction*, 2016, 31(4): 816-817.
- [38] PARK B, LEE H, LEE Y, et al. Cilostamide and forskolin treatment during pre-IVM improves preimplantation development of cloned embryos by influencing meiotic progression and gap junction communication in pigs[J]. *Theriogenology*, 2016, 86(3): 763-764.
- [39] XIONG X R, LAN D L, LI J, et al. Supplementation of cilostazol during in vitro maturation enhances the meiosis and developmental competence of yak oocytes by influencing cAMP content and mRNA expression[J]. *Animal Reproduction Science*, 2017, 186:21.
- [40] RALL W. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at-196 C by vitrification[J]. *Nature*, 1985, 313 (6003):573-574.
- [41] BRAMBILLASCA F, GUGLIELMO M C, COTICCHIO G, et al. The current challenges to efficient immature oocyte cryopreservation[J]. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2013, 30(12): 1532-1533.
- [42] PAN Y, CUI Y, HE H, et al. Developmental competence of mature yak vitrified-warmed oocytes is enhanced by IGF-I via modulation of CIRP during in vitro maturation [J]. *Cryobiology*, 2015, 71(3): 493.
- [43] SPRIGGIO J F, MORAIS K S, YANG B S, et al. Effect of the exposure to methyl- $\beta$ -cyclodextrin prior to chilling or vitrification on the viability of bovine immature oocytes [J]. *Cryobiology*, 2012, 65(3): 323.
- [44] SPRIGGIO J F, MORATÓ R, ARCARONS N, et al. Assessment of the effect of adding L-carnitine and/or resveratrol to maturation medium before vitrification on in vitro-matured calf oocytes[J]. *Theriogenology*, 2017, 89: 54-55.

## Analysis of Factors Influencing in Vitro Maturation of Yak Oocytes

GUO Shao-ke<sup>1</sup>, PEI Jie<sup>1</sup>, SONG Ren-de<sup>2</sup>, LI Ji-ye<sup>3</sup>, BAO Peng-jia<sup>1</sup>, LIANG Chun-nian<sup>1</sup>, GUO Xian<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Yak Breeding Engineering of Gansu Province, Lanzhou Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730050; 2. Yushu Center for Animal Disease Control and Prevention, Yushu, Qinghai 815099; 3. Qinghai Datong Breeding Farm, Xining 810102)

**Abstract:** Yak was an important breed in the Qinghai-Tibet Plateau, which can provide the herdsmen with the means of production and living. However, the fertility of yaks was low, usually one litter in two years or two litters in three years, and the progress of breeding and improvement is slow. As an essential step of in vitro fertilization and embryo development, oocyte maturation culture in vitro had been applied in scientific research and reproductive production of yaks. Because the maturation ability of yak oocytes in vitro was much lower than that in vivo, it was of great significance to improve the conditions and the maturation rate of yak oocytes in vitro culture for the development of yak breeding technology and breeding production. In this study, the factors affecting oocyte maturation in vitro were analyzed from the aspects of ovary preservation, oocyte collection, oocyte culture and medium additives, so as to improve the quality of oocyte maturation in vitro and provide technical reference for yak in vitro fertilization technology.

**Key words:** yak; oocyte; in vitro maturation