

## 重组人促卵泡激素剂量对食蟹猴卵泡发育和排卵同期化的影响

张秀娟<sup>1</sup>, 陈金平<sup>1</sup>, 张全军<sup>2</sup>, 刘朝明<sup>2</sup>, 刘晓明<sup>1</sup>, 赖良学<sup>2</sup>, 张守全<sup>3\*</sup>

(1. 广东省昆虫研究所, 广州 510260; 2. 中国科学院广州生物医药与健康研究所, 广州 510530; 3. 华南农业大学动物科学学院, 广州 510642)

**摘要:** 目的 优化食蟹猴胚胎移植同步受体的处理技术。方法 选择 5~9 岁月经周期正常的成年雌性食蟹猴 37 只, 于出现月经血的第 2~3 天, 每日肌注重组人促卵泡激素 (rhFSH), 按超排剂量和方式分 2 个实验组, 超排供体组、超排受体组, 另有一组自然受体组 (对照组)。结果和结论 2 个实验组超排后卵巢反应全部良好, 超排供体组和超排受体组超排后卵巢的获卵总数 ( $15.18 \pm 6.51$  VS.  $5.67 \pm 3.79$ ) 和平均排卵数 ( $6.77 \pm 3.61$  VS.  $1.00 \pm 0.00$ ) 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 但超排受体组和超排供体组的雌二醇 (E2) 水平浓度差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 变化模式一致, 且超排受体组与超排供体组排卵同期化的准确率可达 83.33%, 而对照组仅为 42.85%, 两者差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

**关键词:** 食蟹猴; 卵泡发育; 排卵同期化

中图分类号: Q959.8 文献标志码: A 文章编号: 1000-7083(2015)03-0407-04

## Effects of rhFSH on Ovarian Follicular Development and Ovulation Synchronization in *Macaca fascicularis*

ZHANG Xiujuan<sup>1</sup>, CHEN Jinping<sup>1</sup>, ZHANG Quanjun<sup>2</sup>, LIU Zhaoming<sup>2</sup>,  
LIU Xiaoming<sup>1</sup>, LAI Liangxue<sup>2</sup>, ZHANG Shouquan<sup>3\*</sup>

(1. Guangdong Entomological Institute, Guangzhou 510260, China;

2. Guangzhou Institutes of Biomedicine and Health, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510530, China;

3. College of Animal Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract: Objective** To optimize effective treatment technology of embryo recipient from *Macaca fascicularis*. **Method** A total of 37 adult female *M. fascicularis* (5~9 years old) were housed in separated cages and the vaginal bleeding was monitored daily to detect the onset of menses. Monkeys with menstrual bleeding in 3 days after recombinant human follicular stimulating hormone (rhFSH) injection were classified into three groups: stimulation donors (SD,  $n = 13$ ), stimulation recipients (SR,  $n = 6$ ) and nature recipients (NR,  $n = 21$ ). **Result and Conclusion** Ultrasonograms results showed that the dual-side of ovaries in SD and SR groups were good on day 8 after rhFSH stimulation. Statistical analysis indicated the number of recovered oocytes and ovulated eggs in SR were lower than those in SD ( $5.67 \pm 3.79$  versus  $15.18 \pm 6.51$ ,  $1.00 \pm 0.00$  versus  $6.77 \pm 3.61$ , respectively,  $P < 0.05$ ), however, the values and profiles of serum E2 concentrations were significantly similar ( $P > 0.05$ ). Meanwhile, the accuracy rate of ovulation synchronization was 83.33% between SR and SD, but only 42.85% between NR and SD. There were significant difference between experiment and control group ( $P < 0.05$ ).

**Key words:** *Macaca fascicularis*; follicular development; ovulation synchronization

非人灵长类动物 (nonhuman primate, NHP) 因与人有着最近的亲缘关系, 且在生殖生理学、神经生物学和病理学等诸多方面最接近于人, 因此是研究人类生命领域最高级的模式动物。NHP 相关繁殖技

术的优化不仅有助于提高动物繁殖效率, 而且对提高转基因灵长类疾病模型制备效率具有重要的应用意义 (Wolf, 2004)。同时, NHP 资源的匮乏和价格昂贵, 使得繁殖技术的优化具有必要性。其中, 食蟹

收稿日期: 2014-05-20 接受日期: 2015-01-23

基金项目: 广州市重大科技专项项目 (No. 2010U1-E00811); 国家重点基础研究发展规划 (973 计划) 项目 (2010CB945001, 2011CB944202)

作者简介: 张秀娟 (1979—), 女, 博士, E-mail: zhangxj67@gdei.gd.cn

\* 通信作者 Corresponding author, 教授, E-mail: sqzhang@scau.edu.cn

猴 *Macaca fascicularis* 因体型小、性格温顺且常年均可繁殖和已完成基因组测序 (Yan *et al.*, 2011) 等优势,近年来在转基因灵长类疾病模型制备研究中备受关注。然而食蟹猴个体平均月经周期天数差异大 (26~34 d) (Sun *et al.*, 2008), 而导致胚胎移植程序中选择自然受体的生殖周期同步性差、准确性低,常常需要很大的观察群体和较高的同步性检测费用的投入,但同时胚胎移植受体的有效选择又是影响模型制备的关键因素 (Yang *et al.*, 2008; Niu *et al.*, 2010), 因此,本研究试图优化食蟹猴胚胎移植同步受体的处理技术。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象与主要试剂

5~9 岁月经周期正常的成年雌性食蟹猴 37 只,由广东蓝岛生物技术有限公司提供,动物许可证号 SCXK(粤)2009-0010。实验猴采用单笼饲养,自动光控 12 h 光照与 12 h 黑暗,笼具中提供镜子和空心球供实验猴玩耍,每天观察月经情况并记录。

重组人促卵泡激素 (recombinant human follicle stimulating hormone, rhFSH) 和重组人绒毛膜促性腺激素 (recombinant human chorionic gonadotropin, rhCG) 为默克公司产品,聚乙烯吡咯烷酮 (polyvinyl pyrrolidone, PVP) 为 Sigma 公司产品,人雌二醇 (E2) ELISA 试剂盒为 Cayman 公司产品。

### 1.2 超数排卵和实验猴分组

食蟹猴群中连续 3 d 内同时观察到月经血的 3~5 只个体组成一实验批次。在出现月经血的第 2~3 天,每日肌注 rhFSH,按超排剂量分 2 个实验组,超排供体组 ( $n=13$ ) 于每日 08:00 和 20:00 注射 25 IU/只 rhFSH,超排受体组 ( $n=6$ ) 采用 30% 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 缓释技术 (胡鹏飞等, 2011), 于每日晨 08:00 注射 25 IU/只 rhFSH,其余为自然受体组 ( $n=21$ )。连续注射 rhFSH 7~8 d 后, B 超检测双侧卵巢超排反应和卵泡发育的大小和数量,并于次日晨 08:00 注射 rhCG 1000 IU/只。

### 1.3 食蟹猴卵母细胞的获取

在无菌手术室手术法获取卵母细胞。要点是腹中线切口并暴露双侧卵巢,直尺测量左右侧超排后卵巢的直径,定义超排后卵巢的大小至少 2 cm 为反应良好;统计卵巢上直径  $\geq 3$  mm 的卵泡数量、平均获卵总数、平均排卵数及其中第二次减数分裂期 (M II) 和第一次减数分裂期 (M I) 卵数量。

### 1.4 E2 的检测

血清样本的采集: rhFSH 注射第 6 天起,连续 4~5 d 于早晨 08:00 采集超排供体组、超排受体组和自然受体组个体的隐静脉血液 1 mL,置于促凝管中,室温放置 30 min,  $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 20 min 分离血清,并立即  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  保存备用。

按照人 E2 ELISA 试剂盒的检测说明书执行。绘制超排供体组、超排受体组和自然受体组的 E2 曲线。

### 1.5 排卵同期化评价

以超排供体组的 E2 曲线为参考标准,统计超排受体组与超排供体组排卵同期化的准确率和月经周期相差 3 d 以内的自然受体组排卵同期化的准确率。

### 1.6 统计分析

采用 Excel 和 SPSS 17.0 软件统计分析。

## 2 结果

### 2.1 rhFSH 剂量对食蟹猴卵泡发育的影响

未经超排处理的食蟹猴卵巢大小如绿豆,而经超排处理后的卵巢显著增大,超排良好的食蟹猴卵巢平均大小在 3 cm 左右,其上布满大小不同的未排优势卵泡和少数排卵后形成的血体。

通过统计 rhFSH 剂量 (即超排供体组和超排受体组) 对食蟹猴卵泡发育的影响 (表 1), 结果表明 2 实验组超排后卵巢全部反应良好, B 超检测超排供体组和超排受体组第 8 天优势卵泡数 (直径  $\geq 3$  mm) 分别为  $2.69 \text{ 个} \pm 0.49 \text{ 个}$  和  $0.75 \text{ 个} \pm 0.48 \text{ 个}$  ( $P < 0.05$ ), 且获卵总数和平均排卵数分别为 ( $15.18 \pm 6.51$  VS.  $5.67 \pm 3.79$ ,  $6.77 \pm 3.61$  VS.  $1.00 \pm 0.00$ ) ( $P < 0.05$ ); 卵巢获得超排供体组中占 45.51% 比例的卵处于 M II 期, 而超排受体组 52.94% 比例的卵处于 M I 期。

### 2.2 rhFSH 剂量对食蟹猴同期排卵的影响

为了找到与超排供体组排卵周期同步的食蟹猴,检测每实验批次食蟹猴血清中 E2 浓度的变化 (即 E2 曲线) 来初步判断超排供体组有无排卵和有无排卵周期同步的受体食蟹猴。一般食蟹猴从注射 rhFSH 的第 7 天起,其体内 E2 的水平逐渐升高,并出现峰值,当天注射 rhCG,引起 E2 急速下降,从而诱发排卵。从图 1 可以看出,超排受体组和超排供体组的 E2 水平变化模式一致,2 组水平浓度差异无统计学意义,于注射 rhCG 当日, E2 浓度达到最高值

表1 rhFSH 剂量对食蟹猴卵泡发育的影响 (Mean ± SD)

Table 1 The effect on follicular development of *Macaca fascicularis* with different rhFSH injection dose (Mean ± SD)

组别	卵巢有反应数(%)	卵巢上卵泡≥3 mm 的数量/只	获卵总数	平均排卵数/只 (%)	M II 期排卵数量 No. of eggs in M II (%)	M I 期排卵数量 No. of eggs in M I (%)
超排供体	13(100%)	2.69 ± 0.49*	15.18 ± 6.51*	6.77 ± 3.61* (40.72%)	6.91 ± 5.05 (45.51%)	2.91 ± 4.18 (19.16%)
超排受体	6(100%)	0.75 ± 0.48	5.67 ± 3.79	1.00 ± 0.00 (17.65%)	1.67 ± 2.08 (29.41%)	3.00 ± 1.73 (52.94%)

注 Note: \*  $P < 0.05$  (t-test).

(410.15  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1} \pm 207.47 \text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$  VS. 433.38  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1} \pm 208.68 \text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 而自然受体组对照血清中各采样点 E2 水平偏低, 峰值仅为 75.42  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1} \pm 22.32 \text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

每实验批次中, 以超排供体食蟹猴的 E2 曲线为参考标准, 所有实验批次中超排受体组与超排供体组排卵同期化的准确率为 5/6 (83.33%), 而月经周期相差 3 d 以内的自然受体组排卵同期化的准确率仅为 9/21 (42.85%)。

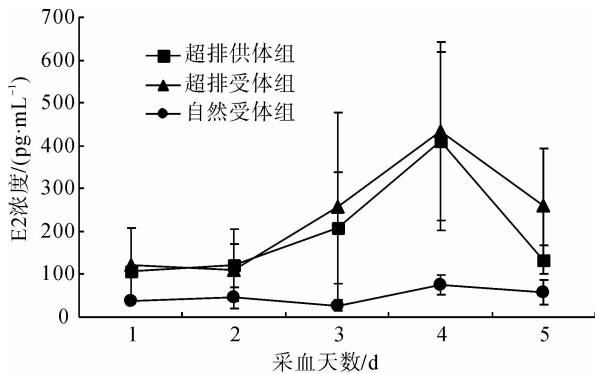


图1 不同 rhFSH 剂量对食蟹猴血清 E2 浓度的影响

Fig. 1 The effect on E2 concentration in serum with different rhFSH injection dose

### 3 讨论

相关繁殖技术在 NHP 的应用已有 20 多年的历史, 通常是体外卵母细胞/早期胚胎的获得和通过胚胎移植建立怀孕 (Bavister, 2004)。目前, NHP 刺激卵泡发育研究主要集中在使用促性腺激素种类、注射时间和剂量方面。近来, 在恒河猴 *M. mulatta* 中应用合成的人促性腺激素, 如人促卵泡激素 (human follicular stimulating hormone, hFSH) 和人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, hCG), 获得了较好的超排效果 (Schramm *et al.*, 2002), 提高了卵母细胞的质量和受精后早期胚胎的发育质量 (Yang *et al.*, 2007)。早期研究表明 PVP 缓释剂可提高奶牛排卵数量 (Yamamoto *et al.*, 1994), 可使绵羊 *Ovis aries* 超排有效率达到 80%, 且卵巢上无大卵泡存留

(曾培坚等, 1996); 本研究中应用 30% 的 PVP 溶解 rhFSH 单次注射方案对食蟹猴进行超排, 超排受体全部有反应, 表明 PVP 既促进了少量卵泡的发育, 又能使超排受体及时排卵, 其缓释促排作用在灵长类动物中可获得较好的应用效果。

在灵长类动物疾病转基因模型建立的过程中, 如何准确把握受体的排卵时间是胚胎移植程序中最重要的一环。灵长类动物排卵受体体内激素水平调控。M II 期成熟的卵泡是在 E2 峰值出现后的 24 h 发生排卵反应的, 而在排卵后约 12 h, 体内黄体素大量分泌, 因此, 常常使用分析灵长类动物血清中 E2 峰值的方法来评估排卵时间。Sun 等 (2008) 研究结果暗示 E2 峰值出现后的 24 ~ 36 h 并伴随受体卵巢上黄体的出现是原核期胚胎移植的最佳时期, 这就意味着超排供体和移植受体的排卵时间是一致的, 或仅相差 12 h 左右。而在本研究中, 采用 30% 的 PVP 溶解低剂量的 rhFSH 单次注射技术, 可有效提高超排供体和超排受体排卵同期化的比例。

本研究表明以每日晨单次注射 30% PVP 溶解的 rhFSH 25 IU/只剂量的方式, 可获得与超排供体排卵同期化准确率较高的移植受体。

### 参考文献:

- 胡鹏飞, 张贵学, 于国庆, 等. 2011. 羔羊卵泡诱导发育、活体采卵和体外发育潜能研究[J]. 畜牧兽医学报, 42(2): 182-189.
- 曾培坚, 石国庆, 皮文辉, 等. 1996. 用聚乙烯吡咯烷酮加 FSH 制剂对绵羊一次注射超排效果试验[J]. 中国养羊, 16(4): 26.
- Bavister B. 2004. The role of animal studies in supporting human assisted reproductive technology[J]. Reprod Fertil Dev, 16(7): 719-728.
- Niu Y, Yu Y, Bernat A, *et al.* 2010. Transgenic rhesus monkeys produced by gene transfer into early-cleavage-stage embryos using a simian immunodeficiency virus-based vector[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 107(41): 17663-17667.
- Schramm RD, Paprocki AM, Bavister BD. 2002. Features associated with reproductive ageing in female rhesus monkeys[J]. Hum Reprod, 17(6): 1597-1603.
- Sun Q, Dong J, Yang W, *et al.* 2008. Efficient reproduction of cynomolgus monkey using pronuclear embryo transfer technique[J]. Proc Natl

- Acad Sci USA, 105(35): 12956-12960.
- Wolf DP. 2004. Assisted reproductive technologies in rhesus macaques [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2: 37.
- Yamamoto M, Ooe M, Kawaguchi M, *et al.* 1994. Superovulation in the cow with a single intramuscular injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone[J]. *Theriogenology*, 41(3): 747-755.
- Yan G, Zhang G, Fang X, *et al.* 2011. Genome sequencing and comparison of two nonhuman primate animal models, the cynomolgus and Chinese rhesus macaques[J]. *Nature Biotechnology*, 29(11): 1019-1023.
- Yang S, He X, Hildebrandt TB, *et al.* 2007. Effects of rhFSH dose on ovarian follicular response, oocyte recovery and embryo development in rhesus monkeys[J]. *Theriogenology*, 67(6): 1194-1201.
- Yang SH, Cheng PH, Banta H, *et al.* 2008. Towards a transgenic model of Huntington's disease in a non-human primate [J]. *Nature*, 453(7197): 921-924.

## 新疆再次记录到鹃头蜂鹰

2014 年 8 月 4 日,笔者在新疆伊犁河大桥附近(43°53'34"N,81°16'52"E)观鸟时拍摄到 1 只猛禽,经鉴定该猛禽为鹃头蜂鹰 *Pernis apivorus* 雄性成鸟,这是该鸟种在中国地区的首次确切记录。邓杰等(1995)曾在阿尔泰地区贾登峪林场附近记录到 2 只鹃头蜂鹰,而马鸣(2011)也曾记载在喀什地区、库车林场和阿尔泰地区有该鸟种的分布。由于这些记录均缺乏实物标本或照片等证据,而未被广泛记述(郑光美,2011;中国观鸟年报编辑,2013)。

鹃头蜂鹰体型中等,体长 52~59 cm,翼展 113~135 cm。头部似杜鹃,颈部纤细。上体灰褐色,下体体色变化较大,但胸腹部通常均具深色斑纹。翅较凤头蜂鹰 *P. ptilorhynchus* 窄,具腕部斑纹,翼下具 4~5 条深色横带。尾长,具 3 条横带,尾侧稍凸起(Beaman & Madge,1999;Mullarney *et al.*,2010)。与凤头蜂鹰的区别是其头部无羽冠,喉中部无黑色斑纹,飞行时明显有 5 枚翼指(初级飞羽),而凤头蜂鹰为 6 枚,另外鹃头蜂鹰的尾部黑色横斑狭窄,而凤头蜂鹰较宽。



鹃头蜂鹰 *Pernis apivorus* (杨庭松 摄)

鹃头蜂鹰分布于欧洲、非洲、中东及中亚地区,在我国周边区域亦有分布,如哈萨克斯坦、吉尔吉斯斯坦、塔吉克斯坦、阿富汗和巴基斯坦等。主要栖息于林区、林间空地、湿地及农田等,在新疆可能会分布于北方林区、草原、河谷湿地及荒漠绿洲等地,主要以胡蜂 *Vespa* spp. 和其他蜂类为食。新疆与中亚各国接壤,生境条件极其相似。因此,鹃头蜂鹰可能会在该地区分布、繁殖,有必要对该鸟种在国内的分布情况作进一步调查,从而进行研究和保护。

杨庭松<sup>1,2</sup>, 蔡新斌<sup>1</sup>, 苟军<sup>2</sup>, 林宣龙<sup>1,2\*</sup>

(1. 新疆林业科学院森林生态研究所,乌鲁木齐 830063; 2. 新疆观鸟会,乌鲁木齐 830011)

\* 通信作者, E-mail: xuanlonglin@163.com

基金项目:新疆第二次陆栖脊椎动物调查项目