

# 豬卵培養於含內泌素之體外成熟培養液時 對卵母細胞之成熟、受精與胚發育能力的 影響

林育安<sup>1</sup>謝來安<sup>2</sup>陳銘正<sup>3</sup>林佳靜<sup>4</sup>

1. 國立宜蘭技術學院應用動物系助教
2. 國立屏東科技大學畜產系副教授
3. 國立宜蘭技術學院應用動物系教授
4. 國立宜蘭技術學院應用動物系副教授

## 摘要

本試驗之目的，乃研究豬卵丘-卵母細胞複合體培養於含有內泌素之體外成熟培養液中之時間長短，對卵母細胞成熟率及受精後之受精率與胚發育率的影響。豬卵丘-卵母細胞複合體分成二組，對照組為培養於含有內泌素與 20% 濾泡液之體外成熟培養液中 48 小時，處理組為前 24 小時於含有內泌素，後 24 小時無內泌素之體外成熟培養液中培養。將部分去除卵丘之卵母細胞固定，其餘進行體外受精，隨後並培養於 NCSU23 培養液中 16 小時與 144 小時，檢查卵母細胞之成熟率、受精率與胚發育率。試驗結果顯示，對照組與處理組之成熟率分別為 76.2% 與 80.7%；受精率為 78.6% 與 82.9%。處理組之雄原核形成率為 58.5% 顯著高於對照組之 37.4% ( $P<0.05$ )。處理組之胚發育率與桑椹胚之比率分別為 80.7% 與 19.4%，均顯著高於對照組之 62.5% 與 3.8% ( $P<0.05$ )。

**關鍵詞：**豬卵母細胞、體外成熟、體外受精

# Effects of The Exposure Duration of Hormonal Supplements on Maturation of Porcine Oocyte and Their Subsequent Fertilizing and Developmental Competence *In Vitro*

Yu-An Lin<sup>1</sup> Lai-An Hsieh<sup>2</sup> Ming-Cheng Chen<sup>3</sup> and Chai-Ching Lin<sup>4</sup>

1. Teaching assistant Department of Applied Animal Science, National Ilan Institute of Technology

2. Associate Professor Department of Animal Science, National Pingtung University of Science and Technology

3. Professor Department of Applied Animal Science, National Ilan Institute of Technology

4. Associate Professor Department of Applied Animal Science, National Ilan Institute of Technology

## Abstract

The objective of this study was to investigate the effects of the exposure duration of hormone supplement on maturation of porcine oocytes and their subsequent fertilizing and developmental capacity *in vitro*. All oocyte-cumulus complexes were divided into two groups. The oocytes of control group were cultured in M199 medium supplemented with hormones and 20% porcine follicular fluid for 48 hours. The oocytes of treatment group were cultured in M199 for 24 hours with hormones, which followed by culturing without hormones for 24 hours. After maturation cultured, a part of the cumulus-free oocytes were fixed, and the others processed fertilizing *in vitro*. Then, fertilizing eggs were transferred into NCSU23 medium for another 16 hours or 144 hours incubation and then fixed to examine. The results show indicate that the maturation rate of control and treatment group were 76.2% and 80.7%, respectively, fertilization rates were 78.6% and 82.9%, respectively. The male pronuclei formation rate of treatment group (58.5%) was significantly higher than the control group (37.4%,  $P < 0.05$ ). The developmental capacity and morulae rates of treatment group (80.7% and 19.4%) were significantly higher than the control group (62.5% and 3.8%,  $P < 0.05$ ).

**Key Words** : Porcine oocyte, Maturation, Fertilization, *In vitro*

## 一、前言

未成熟之豬卵母細胞如同許多其他動物的卵一樣，經離體培養後仍能恢復減數分裂，並發育至第二次減數分裂中期 (Metaphase II)，但這些卵母細胞在適當情況下，藉由精子進行體外受精，結果發現受精卵之雄原核形成率低，且多數為多精入卵者，顯示卵母細胞之成熟率並不高。以往有許多報告指出，將豬卵丘-卵母細胞複合體培養於含有多種內分泌素組合之成熟培養液中：如 PMSG (pregnant mare's serum gonadotropin)、hCG (human chorionic gonadotropin) 和動情素(1,2,3); FSH (follicle-stimulating hormone)、LH (luteinizing hormone) 和助孕素與動情素(4); FSH、LH 與動情素(5); FSH、LH 與助孕素(6); FSH 與 LH(7); LH 與動情素(8); FSH(9)與 LH(7)，均可以提高卵母細胞之細胞核成熟率與卵丘細胞之擴散作用(10)。此外，添加 FSH 與濾泡液(9)或 LH 與濾泡液(7)於成熟培養液中，對於細胞質成熟有改善作用。於體內成熟之卵母細胞受到 LH 潮湧影響而排卵，FSH 或 LH 也會誘發卵丘細胞之擴散(11)。然而，卵母細胞在成熟期間細胞質之成熟被認為是經由內分泌素之改變而調控(12)。故卵母細胞成熟期間內分泌素濃度之變化，可能對卵丘細胞之分泌活性與皮質顆粒細胞之釋出具有重要性。因此，卵母細胞細胞核之減數分裂與細胞質之成熟情形，可能會因離體培養於內分泌素時間之長短而間接地受到影響。

本試驗之目的，乃探討卵丘-卵母細胞複合體培養於內分泌素之時間長短對卵母細胞之成熟率、受精率與胚發育率之影響，俾能對卵母細胞之成熟機制有所了解。

## 二、材料與方法

### (一) 培養液之配製

試驗中所使用成熟培養液為 M-199 溶液 (GIBCO No. 21200-076)。分別添加內分泌素 0.5  $\mu$ g/ml 動情素 (estradiol, E)、2.5  $\mu$ g/ml 濾泡液素 (FSH)、5 IU/ml 黃體生成素 (LH) 與 20 ng/ml 濾泡液素 (luteotropic hormone, LTH) 及 20% 豬濾泡液，經 0.2  $\mu$ m 濾膜 (Minisart<sup>®</sup>, Sartorius) 過濾而得，培養液置於冰箱中冷藏備用。

### (二) 豬濾泡液 (porcine follicular fluid; PFF) 之取得

卵巢置於 PBS 中清洗並將其所殘留之血液擠出，置於滅菌之衛生紙上將表面擦乾，再以 23 G 針筒抽取直徑 3-5 mm 濾泡之濾泡液，經匯集於試管並遠心分離 (600xg、10 分鐘、4 ) 後，取上清液分裝於 1.5 ml 離心管中，每管 1 ml 貯存於 -20 之冷凍櫃中備用。

### (三) 卵巢之來源

本試驗所使用之豬卵母細胞，係取自於宜蘭縣家畜肉品拍賣市場所屠宰之雌性肉豬卵巢。肉豬經屠宰燙毛剖腹後，立即以高壓滅菌過之剪刀，將腹腔兩側之卵巢取下，置於 35 ~ 37 之磷酸緩衝溶液 (phosphate buffered saline; PBS; GIBCO Cat. No. 450-1300)(13)中，並於一小時內將所取得之卵巢攜回實驗室處理。

### (四) 卵母細胞之體外成熟

將自屠宰場取回之卵巢，置於 PBS 中清洗並將其所殘留之血液擠出，後置於直徑 5 公分含有 PBS 之培養皿內，於室溫下以解剖刀將卵巢表面直徑 3 ~ 5 mm 之濾泡逐一刺破，使卵丘-卵母細胞複合體隨著濾泡液流出。略將上層懸浮液抽取後，在顯微鏡下以吸管挑選並收集具有 3 ~ 5 層以上卵丘包被完整之卵丘-卵母細胞複合體。將其置於含 PBS 之培養皿中，待收集完成後，以 PBS 清洗卵丘-卵母細胞複合體三次，分成二組：一組培養於含內分泌素之基礎 M199 成熟培養液中 48 小時為對照組 (control group)，另一組培養於前 24 小時含內分泌素，後 24 小時不含內分泌素之培養液中為處理組 (treatment group)，各培養皿 (直徑 3.5 公分) 分別滴三滴 50  $\mu$ l 微滴 (microdrop) 之成熟培養液，每一微滴含有 10 個卵丘-卵母細胞複合體，並在培養液之上層覆蓋 2 ml 之礦物油 (Sigma No. M-8410)，然後置於 39<sup>°</sup>、5% CO<sub>2</sub>、95% 空氣與相對濕度為 95 ~ 100% 之培養箱內培養 48 小時，俾完成卵母細胞之體外成熟培養。

### (五) 精液之來源

本試驗所使用之公豬，為來自國立宜蘭技術學院畜產系牧場，業經應用體外受精技術證明具有生殖能力之杜洛克純種公豬，其年齡約在 3 至 3.5 歲之間，公豬精液以手握法將射出精液裝於燒杯中，於 20<sup>°</sup> 恆溫箱中靜置 16 小時。

## (六) 卵母細胞之體外受精

### 1、精子體外獲能

將靜置 16 小時之公豬精液與含有 0.1% 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 之生理鹽水 (0.9% NaCl) 以 1:1 的比例混合後, 於 20、200 xg 遠心分離 3 分鐘, 取 5ml 之上層液, 再加 5ml 之 BSA 生理鹽水, 混合後以 1200 xg 遠心分離 3 分鐘, 去除上清液, 再加入 10ml 之 BSA 生理鹽水, 依上述步驟再重複一次, 俾進一步洗去精漿成分。當最後一次離心結束, 將上層液去掉, 加入 pH7.8 之獲能培養液(13)懸浮成 2ml 之液體量, 置於 37、5% CO<sub>2</sub>、95% 空氣與相對濕度為 95~100% 之恆溫培養箱內靜置 1 小時, 以完成獲能作用。於靜置期間, 同時評估獲能培養液中精子之濃度, 並調整為約含  $2 \times 10^6$ /ml 精子數。

### 2、體外受精

將體外成熟培養 48 小時後之卵丘-卵母細胞複合體, 以吸管吸取置於含有 0.1% 玻尿酸 (hyaluronidase) 之 PBS 溶液中, 以適當口徑之微吸管上下吸放之機械方式, 去除卵母細胞外圍部分之卵丘細胞, 再以 PBS 清洗一次。將收集之卵母細胞, 依照陳等(14)所述之方法, 置於 1.9 ml 之受精培養液中 (pH7.4), 另外吸取 0.9 ml 受精培養液, 並加入 0.1 ml 業經完成獲能作用的精子於離心管中混合, 使濃度成為  $2 \times 10^7$  精子/ml, 之後吸取 0.1 ml ( $2 \times 10^7$  精子/ml) 加入含有卵之受精培養液中, 使最終受精濃度為  $10^6$  精子/ml, 並且在培養液之上層覆蓋 2 ml 之礦物油。於 39、5% CO<sub>2</sub>、95% 空氣與相對濕度為 95~100% 之恆溫培養箱中進行體外受精培養 6 小時。培養終了時, 將所有卵母細胞置於 2 ml PBS 中洗滌, 以適當口徑之微吸管機械式重複吸放步驟, 去除附著於卵母細胞外圍所殘留卵丘細胞及多餘之精子, 再以 NCSU23 胚培養液清洗一次, 隨後將所有卵母細胞分別移入 50  $\mu$ l 微滴之早期胚培養液, 每一微滴含有 10 個卵母細胞, 且在 NCSU23 胚培養液(15)之上層覆蓋 2 ml 之礦物油, 最後置於 39、5% CO<sub>2</sub>、95% 空氣與相對濕度為 95~100% 之恆溫培養箱中繼續培養 8 小時。

## (七) 卵母細胞經受精處理後之培養

卵母細胞經前述體外受精處理後, 移置於 NCSU23 胚培養液中, 在 39、5% CO<sub>2</sub>、95% 空氣與相對濕度為 95~100% 之恆溫培養箱中繼續培養 6 日 (144 小時), 每天更換培養液一次。

## (八) 卵母細胞成熟之評估

成熟培養 48 小時後, 將卵取出, 再依據 Abeydeera et al.(16)所述之方法, 將卵分別鑲嵌定置 (mounting) 於載玻片上, 封蠟 (蠟: 凡士林 = 1:1), 並立即置入固定液 (無水酒精: 冰醋酸 = 3:1 v/v) 中浸泡固定 48 小時之後取出, 放入無水酒精中浸泡 5 分鐘, 再以 1% 之 Lacmoid (1g Lacmoid 溶於 45 ml 冰醋酸中, 加去離子水至 100 ml, 加熱煮沸 30 分鐘, 冷卻以濾紙過濾, 裝瓶) 染劑進行染色, 並立即置於位相差顯微鏡下檢查其成熟情形。

卵母細胞減數分裂各階段的判定, 係依據 Hunter and Polge(17)與 Shea et al.(18)所述: 包括生發泡期 (Germinal Vesicle; GV)、第一次減數分裂前期 (prometaphase I; ProMet I)、第一次減數分裂中期 (Metaphase I; Met I)、第一次減數分裂後期 (Anaphase I; Ana I)、第一次減數分裂末期 (Telophase I; Tel I) 及第二次減數分裂中期 (Metaphase II; Met II)。當檢查卵母細胞時發現卵內具有一個極體 (polar body) 與一組染色體, 則可認定發育到 Met II 之成熟卵母細胞。本試驗卵母細胞成熟率之計算, 是以已成熟之卵母細胞佔該組提供培養之總卵母細胞數之百分率。

## (九) 卵母細胞受精之評估

受精卵經上述方法固定後, 置於位相差顯微鏡下檢查其受精情形。受精之判斷則依據鄭(13)所述之方法為之。檢查結果如有發現在卵母細胞之卵黃膜內, 具有鑽入且已經膨脹之精子頭部與殘留之精子尾部, 始判定為受精卵; 若同一卵母細胞內同時具有二隻或以上之精子者, 則判定為多精入卵。受精卵內具有完整之雄原核膜, 始被判定為雄原核形成。本試驗受精率之計算, 是以被發現有精子穿入之已受精卵母細胞, 及已達原核發育階段之受精卵之和, 佔該組體外成熟之總卵母細胞數之百分率。單精入卵率之計算, 是以被一隻精子穿入之卵母細胞數, 佔該組已受精之總卵母細胞數之百分率。多精入卵率之計算, 是以被二隻或以上精子穿入之卵母細胞數, 佔該組已受精之總卵母細胞數之百分率。雄原核形成率之計算, 是以已受精具有雄原核形成之卵母細胞數, 佔該組已受精之總卵母細胞數之百分率。

## (十) 受精後胚發育之評估

卵受精後繼續培養 6 日 (144 小時), 之後觀察胚發育之情形 (圖 1)。胚發育期別之判定則依據吳(19)所述之方法為之。先將胚置於位相差顯微鏡下觀察胚葉細胞 (blastomere) 之數目, 並配合固定及染色方法, 以確認胚葉細胞之細胞核數目, 作為

胚發育期別判定之依據(圖 2)。若在鏡檢外觀上,未發現正常之胚葉細胞時,均歸列為未進一步發育者。本試驗受精後正常胚發育率之計算,是以經鏡檢確認含 2 個胚葉細胞(含細胞核)以上之胚數,佔該組經體外成熟提供受精之總卵母細胞數之百分率。

### (十一) 統計分析

本試驗處理中,卵母細胞之成熟率、受精率、雄原核形成率與胚發育率,先以 Arcsin 轉角度法(Arcsin transformation)後(20)再利用 SAS (1996) 套裝軟體進行分析,並以 Student's T-test (21),比較對照組與處理組間差異之顯著性。

## 三、結果與討論

### (一) 含內泌素之培養時間對豬卵母細胞體外成熟之影響

表 1 所示豬卵母細胞培養於前 24 小時含內泌素,後 24 小時不含內泌素與培養於 48 小時完全含內泌素之成熟培養液中,成熟率分別為 80.7 與 76.2%,二組間無顯著差異。

Funahashi and Day(22)指出,豬卵母細胞培養於不含內泌素(對照組)或前 20 小時含有內泌素,後 20 小時不含內泌素與培養於 40 小時完全含內泌素之 M199 成熟培養液(含 10% 豬濾泡液)中,成熟率分別為 54、90 與 88%,二處理組均比對照組為高,惟二處理組間無顯著差異。本試驗結果與 Funahashi and Day (22)所述相似,但成熟率稍低。先前報告指出,成熟培養液中添加內泌素(FSH、LH、E、Prolactin、PMSG 或 hCG),可提高豬卵母細胞核之成熟並促使周圍卵丘擴散(10)。另外,如添加 FSH 與濾泡液(9),或是 LH 與濾泡碎片(follicular shells)(7)於培養液中,對細胞質之成熟均有改善效果。豬卵母細胞培養於不含內泌素之培養液中,雖然有些卵母細胞會恢復減數分裂,引起生發泡瓦解及使卵成熟,惟成熟率很低。豬卵如培養於前 20 小時含有內泌素與完全培養於含內泌素中 40 小時,對卵之成熟率並無影響,可能卵母細胞於成熟培養前 20 小時才需要內泌素之參與,此參與作用會因卵丘細胞擴散,使卵與卵丘細胞間之隙聯合被阻斷,而阻止內泌素之作用。卵於體外成熟期間分成二個階段,細胞核成熟與細胞質成熟。細胞核成熟是藉由內泌素的參與來調節,而細胞質成熟則在無內泌素的作用下,對細胞質成熟有促進作用(22)。體內給予 hCG 或體外培養添加 hCG 20 小時後,卵母細胞生發泡才會完全瓦解(23; 24),由此可見卵母細胞於成熟培養時必需在含有內泌素之培養液中至少培養 20 小時,方能使卵母細胞之生發泡完全瓦解。

### (二) 含內泌素之培養時間對豬卵母細胞體外受精之影響

表 2 所示豬卵母細胞培養於前 24 小時含內泌素,後 24 小時不含內泌素與培養於 48 小時均含內泌素之成熟培養液中,受精率分別為 82.9 與 78.6%,多精入卵率為 88.0 與 89.3%,彼此間無顯著差異。惟在雄原核形成率方面,僅前 24 小時含有內泌素者(58.5%)較 48 小時均含有內泌素者(37.4%)為高( $P<0.05$ )。

Funahashi and Day (22)指出,豬卵母細胞培養於前 20 小時含有內泌素,後 20 小時不含內泌素與培養於 40 小時均含內泌素之成熟培養液(含 10% 豬濾泡液)中,受精率與多精入卵率分別均為 96 與 95%,彼此間無顯著差異,惟在雄原核形成率方面,以前 20 小時含有內泌素(67%)較 40 小時均含有內泌素組者(36%)為高( $P<0.05$ )。本試驗之結果與 Funahashi and Day(23)所述相似,惟受精率與多精入卵率較其報告稍低些。

Naito et al.(9)將豬卵母細胞培養於不含濾泡液與內泌素之培養液中,雄原核形成率只有 38.6%,只培養於均內泌素之培養液中,對雄原核形成率也無改善,惟在含有 5 ~ 100% 濾泡液與內泌素之培養液中培養 48 小時,可提高雄原核形成率(61.1 ~ 81.0%)。顯示濾泡液與激性腺素之協同作用,可提高卵母細胞之雄原核形成率。然而在 Funahashi and Day (22)報告中卻指出,豬卵母細胞培養於含 10% 濾泡液與內泌素之培養液中 40 小時,雄原核形成率只有 36%,與 Naito et al.(9)所述不同,渠等認為乃成熟培養時間較短所致,如以相同培養液培養 50 小時,則發現雄原核形成率可提高至 59%,顯示卵母細胞之成熟培養時間會影響雄原核形成率。另外, Funahashi and Day (22)也指出且內泌素濃度之改變亦會影響雄原核形成率。卵母細胞前期培養於含有內泌素之培養液中,可以提高雄原核形成率。本試驗結果與 Funahashi and Day (22)相似,即卵母細胞僅在體外培養前期之培養液中含有內泌素,則可以提高雄原核形成率。是否卵在含有內泌素之培養液中培養太久,可能產生抑制雄原核形成之因子,而影響卵母細胞之雄原核形成率,仍有待進一步探討。

### (三) 含內泌素之培養時間對豬卵母細胞體外受精後胚發育之影響

表 3 所示者為培養於前 24 小時含內泌素組與培養於 48 小時均含內泌素組，經受精後培養於 NCSU23 胚培養液中，卵裂率分別為 80.7% 與 62.5% ( $P<0.05$ )，發育到 2 細胞、4 細胞與 8 細胞之比率，彼此間無顯著差異，惟發育到桑椹胚之比率，以前 24 小時含有內泌素組較 48 小時均含有內泌素組者為高 (19.4% 與 3.8%， $P<0.05$ )。

吳(20)將豬卵母細胞培養於含有內泌素與 20% PFF 之 M-199 成熟培養液中 48 小時，經體外受精後，再培養於 mBMOC-2 胚培養液中，胚發育率為 32.4%。Yoshida et al.(2)將豬卵母細胞培養於含有內泌素與 10% PFF 之 M-199 成熟培養液中 36 小時，經體外受精後，再培養於 Earl's 胚培養液中，胚發育率為 54%。鄭等(25)將豬卵母細胞培養於含有內泌素與 20% PFF 之 M-199 成熟培養液中 48 小時，經體外受精後，再培養於 mBMOC-2 胚培養液中，胚發育率為 27%。本試驗豬卵培養於均含內泌素之成熟培養液中 48 小時，胚發育率均較吳(19)、Yoshida et al.(2) 與鄭等(25)所述為高，顯示胚發育率會因胚培養液不同而有所差異。至於吳(19)和鄭等(25)使用相同的胚培養液培養，卻發現吳(19)較鄭等(25)之胚發育率為高，可能是卵巢之來源與各實驗室操作模式差異所造成。

Wang et al.(26)將豬卵母細胞培養於前 22 小時含有內泌素，後 22 小時無內泌素之 M-199(含 10% PFF) 成熟培養液中，經體外受精後，胚發育率為 61%，囊胚率為 19%。本試驗豬卵母細胞體外成熟培養 48 小時，再經體外受精後胚之發育率均較(2,19,25)為高，可能是因卵巢之來源與公豬精液性狀與培養模式不同而有所差異。

本試驗之結果顯示，培養於前 24 小時含內泌素組比培養於 48 小時均含內泌素組有較高之胚發育率 (80.7% 與 62.5%， $P<0.05$ )。Yoshida et al. (27)指出在成熟培養液中添加內泌素，可以提高卵丘卵母細胞複合體之細胞核成熟與卵丘細胞之擴散。惟此等卵母細胞經受精後雄原核形成率低，顯示大部分卵母細胞之細胞質未能完全成熟。Mattioli et al.(28)指出體外成熟期間完全培養於含有內泌素之卵母細胞，會降低卵母細胞形成雄原核之能力，可能是因在體外成熟期間，培養液、卵丘細胞與卵母細胞細胞質間之相互影響所致。Osborn and Moor(12)指出，卵母細胞於成熟期間細胞質成熟作用深受內泌素之變化所調控。因此，卵母細胞減數分裂與細胞質之成熟，可能受暴露於內泌素之濃度與期間長短之影響。Funahashi and Day(22)與 Funahashi et al.(30)指出，卵母細胞培養於前 20 小時含有內泌素之成熟培養液中有利於生發泡瓦解，之後將卵母細胞培養於不含內泌素之成熟培養液中，則有利於受精後雄原核的形成。O'Brien et al.(30)指出綿羊卵完全培養於含有內泌素成熟培養液中，對於胚的發育則有不利的影響。本試驗培養於前 24 小時含內泌素組比培養於 48 小時均含內泌素組，受精後有較高之雄原核形成，可能是促使胚發育率較高之原因。

#### 四、參考文獻

1. Yoshida, M., Y. Ishizaki and H. Kawagishi (1990), Blastocyst formation by pig embryos resulting from *in-vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*, J. Reprod. Fert, Vol. 88, pp. 1-8.
2. Yoshida, M., K. Ishigaki and V. G. Pursel (1992), Effect of maturation media on male pronucleus formation in pig oocytes matured *in vitro*, Mol. Reprod. Dev, Vol. 31, pp. 68-71.
3. Wang, W. H., K. Niwa and K. Okuda (1991), *In-vitro* penetration of pig oocytes matured in culture by frozen-thawed ejaculated spermatozoa, J. Reprod. Fert, Vol. 93, pp. 491-496.
4. Mattioli, M., G. Galeati, M. L. Bacci and E. Seren (1988b), Follicular factors influence oocyte fertilizability by modulating the intercellular cooperation between cumulus cells and oocyte, Gamete. Res, Vol. 21, pp. 223-232.
5. Zheng Y. S. and M. A. Sirard (1992), The effect of sera, bovine serum albumin and follicular cells on *in vitro* maturation and fertilization of porcine oocytes, Theriogenology, Vol. 37, pp. 779-790.
6. Nagai, T. and R. M. Moor (1990), Effect of oviduct cells on the incidence of polysperm in pig eggs fertilized *in vitro*, Mol. Reprod. Dev, Vol. 26, pp. 377-382.
7. Mattioli, M., M. L. Bacci, G. Galeati and E. Seren (1991), Effect of LH and FSH on the maturation of pig oocytes *in vitro*, Theriogenology, Vol. 36, pp. 95-105.

8. Nagai, T., T. Takahashi, H. Masuda, Y. Shioya, M. Kuwayama, M. Fukushima, S. Iwasaki and A. Hanada (1988) , *In-vitro* fertilization of pig oocytes by frozen boar spermatozoa , J. Reprod. Fert, Vol. 84, pp. 585-591.
9. Naito, K., Y. Fukuda and Y. Toyoda (1988) , Effects of porcine follicular fluid on male pronucleus formation in porcine oocytes matures *in vitro* , Gamete. Res, Vol. 21, pp. 289-295.
10. Prochazka, R. E. Nagyova, Z. Rimkevieveova, T. Nagai, K. Kikuchi and J. Motlik (1991) , Lack of effect of oocyctectomy on expansion of the porcine cumulus , J. Reprod. Fert, Vol. 93, pp. 569-576.
11. Hillensjo, T. and C. P. Channing (1980) , Gonadotrophin stimulation of steroidogenesis and cellular dispersion in cultured porcine cumuli oophori , Gamete Res, Vol. 3, pp. 233-240.
12. Osborn, J. C. and R. M. Moor (1983) , The role of steroid signals in the maturation of mammalian oocytes , J. Stero. Bioch, Vol. 19, pp. 133-137.
13. 鄭登貴 (1985) , 「試管豬-豬卵體外受精之研究」 , 畜產研究, 第十八卷, 第一期, 第 99-142 頁。
14. 陳銘正、馬春祥、鄭登貴 (1995) , 「電穿孔處理對豬精子受精能力之影響」 , 中畜會誌, 第二十四卷, 第四期, 第 435-447 頁。
15. Long, C. R., J. R. Dobrinsky and L. A. Johnson (1999) , *In vitro* production of pig embryos: Comparisons of culture media and boars , Theriogenology, Vol. 51, pp. 1375-1390.
16. Abeydeera, L. R., W. H. Wang, and T. C. Cantley (1998) , Presence of epidermal growth factor during *in vitro* maturation of pig oocytes and embryo culture can modulate blastocyst development after *in vitro* fertilization , Mol. Reprod. Dev, Vol. 51, pp. 395-401.
17. Hunter, R. H. F. and C. Polge (1966) , Maturation of follicular oocytes in the pig after injection of human chorionic gonadotrophin , J. Reprod. Fert, Vol. 12, pp. 525-531.
18. Shea, B. F., J. P. A. Latour, K. N. Bedirian and R. D. Baker (1976) , Maturation *in vitro* and subsequent penetrability of bovine follicular oocytes , J. Anim. Sci, Vol. 43, No. 4, pp. 809-815.
19. 吳信志 (1990) , 「培養液中添加內泌素和豬濾泡液對豬卵母細胞于體外成熟和受精後發育能力之影響」 , 國立中興大學畜牧學研究所碩士論文。
20. Choi, Y. H., Y. Okada, S. Hochi, J. Braun, K. Sato and N. Oguri (1994) , *In vitro* fertilization rate of horse oocytes with partially removed zonae , Theriogenology, Vol. 42, pp. 795-802.
21. Snedecor, G. W. and W. G. Cochran (1967) , Statistical methods , 6<sup>th</sup> Edit. The Iowa State University Press, Ames, Iowa, U. S. A.
22. Funahashi, H. and B. N. Day (1993) , Effects of the duration of exposure to hormone supplements on cytoplasmic maturation of pig oocytes *in vitro* , J. Reprod. Fert, Vol. 98, pp. 179-185.
23. Ainsworth, L., B. K. Tsang, B. R. Downey, G. J. Marcus and D. T. Armstrong (1980) , Interrelationships between follicular fluid steroid levels, gonadotropin stimuli, and oocyte maturation during preovulatory development of porcine follicles , Biol. Reprod, Vol. 23, pp. 621-627.
24. Naito, K. and Y. Toyoda (1991) , Fluctuation of histone H1 kinase activity during meiotic maturation in porcine oocytes , J. Reprod. Fert, Vol. 93, pp. 467-473.

25. 鄭三寶、黃尉東、朱志成、吳信志 (1997), 「濾泡液對豬卵母細胞於離體 (in vitro) 成熟作用之影響」, 中國畜牧學會會誌, 第二十六卷, 第一期, 第 37-53 頁。
26. Wang, W. H., L. R. Abeydeera, T. C. Cantley and B. N. Day (1997), Effects of oocyte maturation media on development of pig embryos produced by *in vitro* fertilization, J. Reprod. Fert, Vol. 111, pp. 101-108.
27. Yoshida, M., K. Bamba and Y. Kojima (1989), Effects of gonadotropins and estradiol-17 on the timing of nuclear maturation and cumulus mass expansion in pig oocytes cultured *in vitro*, Jpn. J. Anim. Reprod, Vol. 35, pp. 86-91.
28. Mattioli, M., G. Galeati and E. Seren (1988a), Effect of follicle somatic cells during pig oocyte maturation on egg penetrability and male pronucleus formation, Gamete. Res, Vol. 20, pp. 177-183.
29. Funahashi, H., T. C. Cantley and B. N. Day (1994), Different hormonal requirement of porcine oocyte-complexes during maturation *in vitro*, J. Reprod. Fert, Vol. 101, pp. 159-165.
30. O' Brien, J. K., S. L. Rhodes, W. M C. Maxwell and G. Evans (1994), Hormonal requirements for *in vitro* maturation of sheep oocytes, Theriogenology, Vol. 41, pp. 266.

91 年 09 月 20 日投稿

91 年 10 月 09 日接受



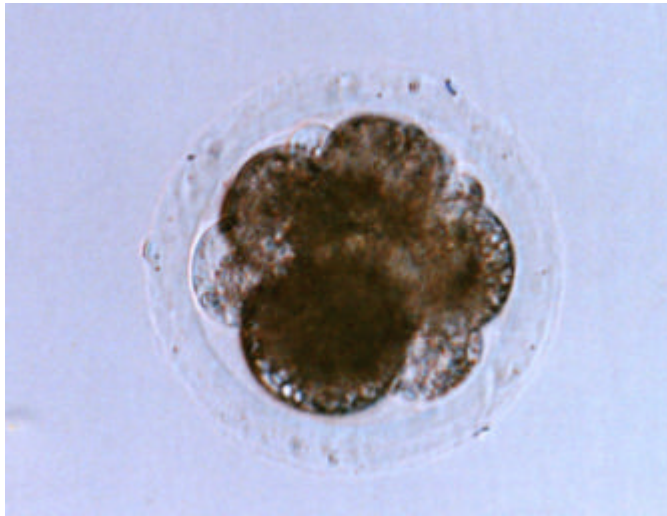


圖 1. 受精後發育到 8 細胞的豬胚 (600x)

Fig 1. The 8 cells stage of porcine embryo development after fertilization (600x)

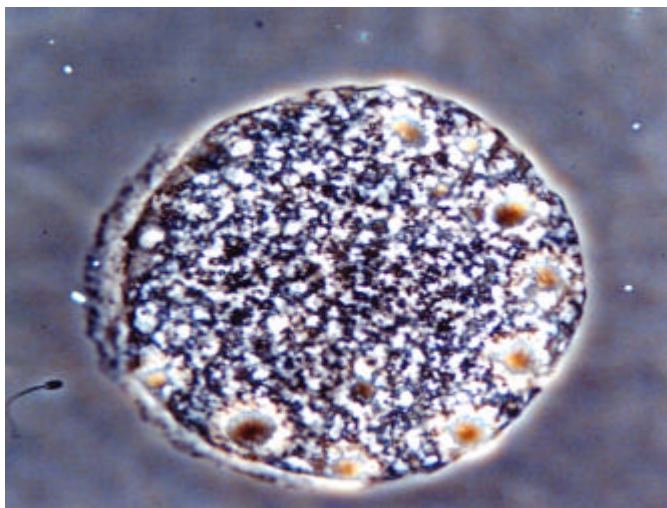


圖 2. 經固定染色後具 8 細胞核以上的豬胚 (400x)

Fig 2. The porcine embryo with Above 8 pronuclear after fixing and staining (400x)

表 1. 豬卵母細胞培養於含有內泌素之時間對體外成熟之影響

Table 1. Effect of exposure duration of hormones supplements on maturation of porcine oocyte *in vitro*

組別	總卵數	重複次數	卵母細胞在各減數分裂階段之百分率		
			GV <sup>C</sup>	Met I <sup>C</sup>	Met II <sup>C</sup>
Group	No. of oocytes	Replicates	% of oocytes in meiotic stage		
A	88	3	5.7 ± 4.0	13.6 ± 0.3	80.7 ± 4.1
B	88	3	10.3 ± 3.6	13.5 ± 5.6	76.2 ± 3.0

A 為豬卵母細胞前 24 小時培養在含有 20% 豬濾泡液及內泌素之成熟培養液中，後 24 小時培養在不含有內泌素之成熟培養液中。

Porcine oocytes were cultured for 24 hr in a medium containing 20% porcine follicular fluid (PFF) and hormones, and were then transferred to the maturation medium without hormones for another 24 hr.

B：為豬卵母細胞在含有 20% 豬濾泡液及內泌素之成熟培養液中培養 48 小時。

Porcine oocytes were cultured for 48 hr in the maturation medium containing 20% porcine follicular fluid (PFF) and hormones.

C: 平均 ± 標準機差； GV: 生發泡； Met I: 第一次減數分裂中期； Met II: 第二次減數分裂中期

C: Mean ± S. E. ; GV : Germinal Vesicle ; Met I: Meaphase I ; Met II: Meaphase II

表 2. 豬卵母細胞培養於含有內泌素之時間對豬卵母細胞體外受精之影響

Table 2. Effect of exposure duration of hormones supplements on fertilization of porcine oocytes matured *in vitro*

組別	總卵數	重複次數	成熟率 (%)	穿透率 (%)	多精入卵率 (%)	平均每個卵母 細胞精子穿透 數	雄原核形成率 (%)
Group	No. of oocytes	Replicates	% of oocytes matured <sup>C</sup>	Penetrated <sup>C</sup> (%)	Polyspermy <sup>C</sup> (%)	No. of sperm penetration /per oocyte <sup>C</sup>	Pronuclei formation (%)
A	81	3	86.4 ± 2.1	82.9 ± 4.4	88.0 ± 2.6	2.77 ± 7.86	58.5 ± 5.6 <sup>a</sup>
B	84	3	83.4 ± 5.0	78.6 ± 2.4	89.3 ± 4.2	2.83 ± 7.26	37.4 ± 8.9 <sup>b</sup>

同行中數據不具相同英文字母 (a, b) 者, 表示具有統計上差異 (P<0.05)。

Data within the same column without common superscripts (a, b) indicate statistically significant differences (P<0.05).

A: 為豬卵母細胞前 24 小時培養在含有 20% 豬濾泡液及內泌素之成熟培養液中, 後 24 小時培養在不含有內泌素之成熟培養液中。

Porcine oocytes were cultured for 24 hr in a medium containing 20% porcine follicular fluid (PFF) and hormones, and were then transferred to the maturation medium without hormones for another 24 hr.

B: 為豬卵母細胞在含有 20% 豬濾泡液及內泌素之成熟培養液中培養 48 小時。

Porcine oocytes were cultured for 48 hr in the maturation medium containing 20% porcine follicular fluid (PFF) and hormones.

C: 平均 ± 標準機差

C: Mean ± S. E.

表 3. 豬卵母細胞培養於含有內泌素之時間對豬胚體外發育之影響

Table 3. Effect of exposure duration of hormones supplements on development of porcine oocytes matured and fertilized *in vitro*

組別	總卵數	重複數	卵裂率	胚發育至各胚期之百分率			
				2 細胞	4 細胞	8 細胞	桑椹胚
Group	No. of oocytes	Replicates	% of oocytes cleaved <sup>C</sup>	% of embryo developed to			
				2 cell <sup>C</sup> (%)	4 cell <sup>C</sup> (%)	8 cell <sup>C</sup> (%)	Morula <sup>C</sup> (%)
A	80	3	80.7 ± 6.4 <sup>a</sup>	13.2 ± 7.9	26.4 ± 3.7	21.6 ± 3.9	19.4 ± 6.6 <sup>a</sup>
B	77	3	62.5 ± 5.5 <sup>b</sup>	19.3 ± 6.0	24.8 ± 3.3	14.6 ± 7.0	3.8 ± 3.7 <sup>b</sup>

同行中數據不具相同英文字母 (a, b) 者, 表示具有統計上差異 (P<0.05)。

Data within the same column without common superscripts (a, b) indicate statistically significant differences (P<0.05).

A: 為豬卵母細胞前 24 小時培養在含有 20% 豬濾泡液及內泌素之成熟培養液中, 後 24 小時培養在不含有內泌素之成熟培養液中。

Porcine oocytes were cultured for 24 hr in a medium containing 20% porcine follicular fluid (PFF) and hormones, and were then transferred to the maturation medium without hormones for another 24 hr.

B: 為豬卵母細胞在含有 20% 豬濾泡液及內泌素之成熟培養液中培養 48 小時。

Porcine oocytes were cultured for 48 hr in the maturation medium containing 20% porcine follicular fluid (PFF) and hormones.

C: 平均 ± 標準機差

C: Mean ± S. E.

