

精液品質及卵丘細胞之去除對體外培養牛胚發育 之影響⁽¹⁾

蕭振文⁽²⁾ 陳裕信⁽²⁾ 楊鎮榮⁽²⁾ 蔡麗卿⁽²⁾ 曲鳳翔⁽²⁾
沈朋志⁽²⁾ 李善男⁽³⁾ 陳立人⁽²⁾⁽⁴⁾

收件日期：92 年 11 月 8 日；接受日期：93 年 5 月 4 日

摘 要

本研究旨在探討牛胚體外生產系統中，冷凍精液品質及卵丘細胞去除與否對牛胚發育率之影響。試驗分為二部份，試驗一利用精子分析儀 (HTM-IVOS型，Hamilton-Thorn，USA) 檢測公牛冷凍精液解凍後之品質。主要分析項目包括精子濃度、精子存活率及前進精子率。同時，探討其對體外受精後之牛胚受精率與發育率之影響。試驗二探討牛成熟卵母細胞外之卵丘細胞部份或完全去除再進行體外受精，對其受精率與胚後續發育率的影響。試驗一之結果顯示A與B二頭進口公牛之冷凍精液性狀，精液濃度分別為 33.5 與 37.1×10⁶/ml、精子存活率為 40.3%與 44.0%、前進精子率為 10.6%與 32.0% (P<0.05)、畸型率為 16.3% 與 7.6% (P<0.05)。分析結果顯示B公牛冷凍精液解凍後之品質優於A公牛者。利用A與B公牛冷凍精液解凍後進行體外受精，受精卵之分裂率分別為 9.7 %與 46.3%，發育至囊胚之百分率分別為 0.4%與 5.1%，B公牛精液受精率與胚後續發育率顯著優於A公牛精液者 (P<0.05)。試驗二之第一與第二組使用玻璃針進行機械式吸放去除部份或全部卵丘細胞，第三與第四組先使用玻尿酸酶 (hyaluronidase) 處理後，再配合玻璃針吸放以去除部份或全部卵丘細胞。結果顯示，第一、第二、第三、第四組之分裂率與發育至囊胚之百分率分別為 46.7%與 10.7%、35.5%與 4.3%、39.9%與 10.1%、30.7%與 3.3%，以玻璃針機械式吸放或配合玻尿酸酶部份去除卵丘細胞組，其分裂率與發育至囊胚百分率均優於完全去除卵丘細胞者。由試驗一與試驗二之結果，得知公牛精液性狀優者，進行體外受精可獲得較佳的分裂率及胚發育率。而進行體外受精前，完全去除包覆在牛卵母細胞外的卵丘細胞，將對受精後之分裂率及胚後續發育率造成不利的影響。

關鍵詞：精液品質、牛胚、卵丘-卵母細胞複合體、體外受精。

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1231 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所生理組。

(3) 行政院農業委員會畜產試驗所副所長室。

(4) 通訊作者。

緒 言

牛胚的體外生產 (*in vitro* production, IVP) 系統包括卵子的體外成熟 (*in vitro* maturation, IVM)、體外受精 (*in vitro* fertilization, IVF) 及體外培養 (*in vitro* culture, IVC) 三個過程。體外生產系統之建立，除了有利於牛胚發育學之基礎研究外，亦可提供基因轉殖、核轉殖或胚性別鑑定等研究所需之試驗材料來源 (李等, 1997)。

牛胚體外生產時，所使用的公牛精液品質對於體外受精牛胚之受精率、胚分裂率與後續發育至囊胚之成功率有重要的影響。受精過程包括精子獲能 (capacitation)、精子與卵母細胞之結合並穿過其透明帶、穿透卵黃間隙與卵黃膜融合、致活卵母細胞、精子頭部之去濃縮化 (decondensation) 與雄原核形成等步驟。精子在獲能後發生頭帽反應，釋出玻尿酸酶使精子具有穿透冠狀粒細胞及透明帶的能力。而精液品質與精子活力，將顯著影響牛胚體外生產之受精率與後續發育率 (Parrish *et al.*, 1998)。爲了改善牛胚體外生產效率，在進行體外受精前檢測公牛的精液品質，可能提高牛胚之分裂率與發育率。

在進行體外受精時，卵丘細胞之去除與否對於分裂率及胚發育率的影響曾有學者研究，所得之結果並不一致。部份研究顯示體外受精前去除卵丘細胞將顯著降低胚之分裂率 (Chian and Okuda, 1995; Fatehi *et al.*, 2002)；另有研究則指出，牛胚體外受精時卵丘細胞存在與否並不會增加精子穿透卵母細胞的百分率 (Ball *et al.*, 1983)。然而多數哺乳動物卵母細胞在自然受精時，均仍有卵丘細胞包覆在外圍 (Tanghe *et al.*, 2002)。

本研究之目的即在探討公牛冷凍精液品質對體外受精牛胚之分裂率與發育率之影響；及使用微玻璃管針機械吸放或配合玻尿酸酶將卵丘細胞部份或完全去除後，對體外受精牛胚分裂率與發育率之影響。

材料與方法

I. 卵巢之取得與卵丘-卵母細胞複合體 (cumulus-oocyte complexes, COCs) 之收集

自屠宰場取得牛卵巢，置於室溫的 0.9 %生理鹽水 (含Kanamycin 0.1 mg/ml) 攜回實驗室。卵巢經生理鹽水洗滌後，以 18 號針頭抽取卵巢表面直徑 2~8 mm濾泡內之COCs，隨即置於立體顯微鏡下，依據外圍包覆之卵丘細胞層數判別等級，僅挑選第一與第二級COCs供體外成熟、體外受精及體外培養試驗之用。COCs培養於含有 5% FCS 之TCM-199 成熟培養液中進行 22~24 小時體外成熟。培養條件爲 38.5°C、2% CO₂及相對濕度 95%。

II. 試驗一

利用精子分析儀 (HTM-IVOS型, Hamilton-Thorn, USA)(圖 1) 檢測A與B二頭進口的公牛冷凍精液品質，精子分析儀參數設定乃參考楊等 (2001) 之方法加以適度修正後進行。分析項目包括精子濃度、精子存活率及前進精子率，並以傳統血球計數板 (hemocytometer) 計算精子畸形率。分析之公牛精液調整其最終濃度爲 $1-2 \times 10^6$ /ml並經過獲能處理後，與成熟之卵母細胞進行體外受精 (10 個胚/50 μ l精液小滴) 與體外培養。



圖 1. 分析公牛精液品質之精子分析儀。

Fig. 1. The sperm analyzer used to analyze the semen quality of bulls.

III. 試驗二

採集自屠宰場牛卵巢濾泡之第一與第二級 COCs 經過體外成熟後逢機分為四組，進行部份或完全去除卵丘細胞（圖 2）。試驗二之分組為：第一組利用玻璃針機械吸放方式去除部份卵丘細胞、第二組利用微玻璃針完全去除卵丘細胞、第三組先利用玻尿酸酶處理後輔以玻璃針吸放去除部份卵丘細胞、第四組先利用玻尿酸酶處理後以玻璃微針完全去除卵丘細胞，以探討不同的卵丘細胞去除程度與方式，對卵母細胞經體外受精後之分裂率與發育率之影響。卵丘細胞部份或完全去除後的卵母細胞經培養液清洗後，即置入已完成獲能之精液小滴中，於恆溫培養箱中進行 8 小時體外受精培養。隨即清洗以除去外圍的精子後，再將卵母細胞與單層卵丘細胞共培養。卵母細胞在體外受精後 48 小時開始，每隔 24 小時觀察並記錄胚之分裂率及發育率。

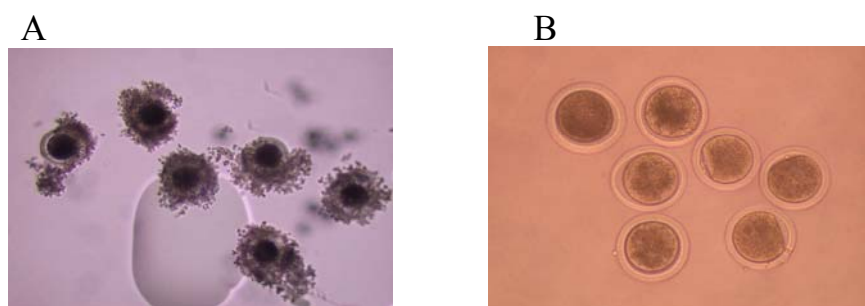


圖 2. 體外受精前去除部份 (A) 或全部 (B) 卵丘細胞後的成熟卵母細胞。

Fig. 2. The cumulus cells of the *in vitro* matured oocytes were partially (A) or totally (B) removed before *in vitro* fertilization.

IV. 統計分析：

試驗一與試驗二處理組間之差異顯著性用統計分析系統 (statistical analysis system, SAS) 之套裝軟體進行卡方分析 (χ^2 -test)。

結果與討論

試驗一分析二頭進口之乳用種公牛冷凍精液，利用 HTM-IVOS 精子分析儀檢測冷凍解凍後之精液品質，分析結如下：A 與 B 二頭公牛之精液濃度為 33.5 與 37.1 $\times 10^6$ /ml、精子存活率為 40.3% 與 44.0%、前進精子率為 10.6% 與 32.0%，而畸型率則為 16.3% 與 7.6% (表 1)。分析結果顯示 B 公牛之精液較 A 公牛者為佳。利用經過檢測的 A 與 B 公牛精液進行體外受精，結果分裂率分別為 9.7% 與 46.3%，發育至囊胚率為 0.4% 與 5.1% (表 2)。以 B 公牛精液體外受精後之牛胚分裂率與發育至囊胚

率均顯著優於A公牛精液者 ($P < 0.05$)。

評估家畜精液品質的方法，傳統上大多採用血球計數板、光電比色計 (Bearden and Fuquay, 1997) 或利用細胞染色法計算精子濃度 (Garner and Johnson, 1995)，配合直接目測鏡檢來評估精子之存活率與活力 (Glover, 1968; Linford *et al.*, 1976)。後來有電腦化影像分析系統及精子分析儀的發展並應用在動物之精液品質分析，能夠精確快速且客觀地評估精子濃度、活精子總數及精子的移動速率等(楊等，2001)；當有數目眾多的公牛精液待測或因應試驗所需的時間緊迫時更能發揮效率。試驗一的結果，選擇精液性狀及精子活力優良的公牛精液進行體外受精，可以提高牛胚體外生產之效率，不致因公牛精子活力不佳而造成牛胚體外生產的損失。而供體外受精用之公牛冷凍精液的保存，將會明顯影響到體外受精的結果，因此貯存精液的液態氮桶應定期檢測液態氮的容量，以維護冷凍精液的最佳品質。

表 1. 利用精子分析儀及血球計數板檢測二頭解凍之公牛精液品質

Table 1. The frozen semen quality of two bulls measured by semen analyzer and hemocytometer

Items	Semen	
	Bull A	Bull B
No. of straws tested	5	5
Concentration ($10^6/\text{ml}$)	33.5 ± 7.6	37.1 ± 5.3
Motile sperm ratio (%)	40.3 ± 3.4	44.0 ± 10.0
Progressive sperm ratio (%)	10.6 ± 3.7^a	32.0 ± 6.6^b
Abnormal sperm ratio (%)	16.3 ± 3.5^a	7.6 ± 3.8^b

^{a, b} Means in the same row with different letters were significantly different ($P < 0.05$).

表 2. 精液品質對體外受精之牛胚分裂率與發育率之影響

Table 2. Effect of bull semen on cleavage rate and development potential of the *in vitro* fertilized bovine embryos *in vitro*

Semen	No. of trials	No. of COCs used for <i>in vitro</i> fertilization	No. of embryos developed to		
			2-cell	16-cell	blastocyst
Bull A	23	474	46 (9.7)* ^a	5 (1.1) ^a	2 (0.4) ^a
Bull B	30	607	281 (46.3) ^b	98 (16.1) ^b	31 (5.1) ^b

^{a, b} Means in the same column with different letters were significantly different ($P < 0.05$).

* Data in parenthesis is No. of embryos developed / No. COCs used for IVF.

試驗二之第一組與第二組使用玻璃針吸放以部份或完全去除卵丘細胞，第三與第四組則使用玻尿酸酶處理後再以玻璃針吸放部份或完全去除卵丘細胞。結果顯示第一、第二、第三與第四組之分裂率與發育至囊胚百分率分別為 46.7%與 10.7%、35.5%與 4.3%、39.9%與 10.1%、30.7%與 3.3% (表 3)。顯示在進行體外受精前，將體外成熟後的卵母細胞以玻璃針或玻尿酸酶部份去除其周圍的卵丘細胞，卵母細胞在體外受精後之分裂率與發育至囊胚率均顯著高於完全去除卵丘細胞者 ($P < 0.05$)。

表 3. 不同方式去除卵丘細胞對成熟卵母細胞體外受精後胚發育率之影響

Table 3. Effect of cumulus cell removal on the development of bovine oocytes after *in vitro* fertilization

Treatment	No. of grade I+II COCs	No. (%) oocytes of development to		
		2-cell	16-cell	blastocyst
I Cumulus-enclosed oocytes*	122	57 (46.7) ^b	29 (23.8) ^b	13 (10.7) ^a
II Cumulus-free oocytes*	138	49 (35.5) ^{ab}	25 (18.1) ^b	6 (4.3) ^b
III Cumulus-enclosed oocytes**	158	63 (39.9) ^b	36 (22.8) ^b	16 (10.1) ^a
IV Cumulus-free oocytes**	153	47 (30.7) ^a	11 (7.0) ^a	5 (3.3) ^b

* Cumulus cells were removed with glass micropipette.

** Cumulus cells were removed with hyaluronidase and glass micropipette.

^{a,b} Means in the same column with different letters were significantly different ($P < 0.05$).

關於動物進行體外受精時，卵丘細胞之去除與否對於卵母細胞受精後之分裂率與胚發育率的影響曾有學者探討，然所獲致的結果並不一致。部份學者指出，卵丘細胞是否包覆卵母細胞，並非牛胚體外受精成敗之必要條件，不論是否有卵丘細胞包覆，精子穿透卵母細胞的百分率沒有差異 (Behalova and Greve, 1993; Cox, 1991)，部份報告則認為，卵丘細胞不利於精子穿透卵母細胞 (Hawk *et al.*, 1992)。然而部份的研究發現，卵丘細胞的存在與否雖並不會造成精子穿透卵母細胞百分率的差異，但去除卵丘細胞後，受精的卵母細胞後續發育卻不利雄原核與雌原核的形成，異常的多精入卵發生率也相對增加 (Behalova and Greve, 1993)。以機械方式去除卵丘細胞，也可能傷害卵母細胞並降低雄原核的形成 (Ball *et al.*, 1983)。在人類胚的研究上，利用純化的玻尿酸酶去除卵丘細胞，發現去除卵丘細胞可以改善胚體外培養的成功率。此對於精子數量不足或是精子活力不佳者，利用機械方式去除卵丘細胞，將提高精子穿透卵母細胞的能力，且不會降低受精率、胚早期發育率及懷孕率 (Mahadevan and Trounson, 1985)。然而在其他以人類胚進行體外培養的研究，發現帶有完整卵丘細胞的卵母細胞與精子進行體外受精 26-48 小時後，其受精率及分裂率分別為 73%與 68%，較裸露卵母細胞之 68%與 56%為高 (Magier *et al.*, 1990)。

Zhang *et al.* (1995) 的研究指出牛卵丘細胞的存在對於其卵母細胞受精與後續發育勝任能力具有促進作用。而 Chian *et al.* (1995) 認為牛卵母細胞體外受精前去除卵丘細胞將顯著降低胚之分裂率。卵丘細胞存在，則可提高牛體外受精時精子穿透卵母細胞的百分率 (Cox *et al.*, 1993; Chian and Okuda, 1995)、分裂率 (Younis *et al.*, 1991; Zhang *et al.*, 1995) 與發育至囊胚之百分率 (Liu *et al.*, 1995)。Fatehi *et al.* (2002) 的研究顯示，成熟的牛卵母細胞在體外受精前去除卵丘細胞與否，牛胚之分裂率分別為 25%與 56%。去除卵丘細胞的裸露卵母細胞添加外源卵丘細胞於受精小滴與否，牛胚之分裂率分別為 37%與 27%。若將去除之卵丘細胞加入體外受精之小滴中，可以增加胚之分裂率。而完全去除卵丘細胞之卵母細胞在含卵丘細胞之培養液中進行受精，可以增加牛胚之分裂率，此種作用可能源自卵丘細胞之分泌作用。相同的受精培養液經過活性炭 (charcoal) 處理，卵丘細胞分泌之小分子蛋白將被去除，使其喪失促進牛胚分裂之效果。此時若於小滴中添加孕酮 (150 ng/ml)，即可恢復其促進其分裂的效果 (Parrish *et al.*, 1988)。因此推測孕酮應是卵丘細胞分泌的因子 (Li *et al.*, 2000)。卵丘細胞的培養液或鬆散的卵丘細胞，皆具有提高裸露卵母細胞受精後的分裂率 (Li *et al.*, 2000; Fatehi *et al.*, 2002)。研究顯示孕酮會影響精子活力與受精率，孕酮可使精子呈現被高度激活 (hyperactivation) 狀態，增加人 (Uhler *et al.*, 1992)、狗 (Sirivaidyapong *et al.*, 1999) 及馬 (Cheng *et al.*, 1998) 精子的頭帽反應與結合卵子透明帶的能力。孕酮可能透過位於精子細胞膜上的孕酮受體而促進精子的受精作用 (Siddiquey and Cohen, 1982; Cheng *et al.*, 1998)。因此，牛胚的體外生產，卵丘細胞分泌的孕酮在體外受精時應扮演關鍵的角色。在其他動物的研究，如大鼠及綿羊在體外受精前

去除卵丘細胞，對受精與胚發育均將產生不利影響 (Vanderhyden and Armstrong, 1989; Staigmiller and Moor, 1984)。在體外培養的條件下，卵丘細胞可以增加小鼠 (Itgki and Toyoda, 1991)、倉鼠 (Bavister, 1982) 及水牛 (Kikuchi *et al.*, 1993) 的受精率。培養液中卵丘細胞的存在，具有促進小鼠卵母細胞受精及胞質成熟的作用 (Yamazaki *et al.*, 2001)。

本研究結果顯示，牛胚體外生產過程中進行體外受精時，卵丘細胞的存在對於受精率及牛胚的後續發育均具有促進之作用，此結論與諸多文獻結果相符合，顯示牛胚的體外受精時，卵母細胞外圍的卵丘細胞具有重要功能。雖然其促進受精作用之真正機制尚不完全清楚，然而由相關研究結果推論，可推論出下列之可能機制：I. 卵丘細胞能吸引具有高度活力的精子接近並卵母細胞結合，同時阻止異常精子進入 COCs (Schroeder and Eppig, 1984)。II. 卵丘細胞包覆於卵母細胞外圍，透過分泌作用與代謝產物，提供適合精子獲能 (Cox *et al.*, 1993; Crozet, 1984)、精子頭部去濃縮化而產生頭帽反應 (Chian and Okuda, 1995; Fukui, 1990)、維持精子活力與存活率以穿透卵母細胞的複雜微環境。III. 卵丘細胞可以防止卵母細胞之透明帶過早硬化或產生細胞質結構異常變化，利於精子穿透透明帶而完成受精作用 (Magier *et al.*, 1990; Legendre and Stewart-Savage, 1993)。IV. 在體外培養條件下，卵丘細胞具有保護卵母細胞的作用 (Magier *et al.*, 1990)。

本研究結果認為，在進行牛胚體外生產時，應該選擇品質良好的公牛冷凍精液進行體外受精。而在進行體外受精前，部份去除牛卵母細胞外圍的卵丘細胞，能夠有效改進牛胚體外生產時之分裂率及後續發育率，進而改善牛胚體外生產系統之效率。

誌 謝

本試驗承蒙國立成功大學附設醫院婦產科人工生殖實驗室洪貴香小姐協助精子分析儀之準備與操作事宜，特此致謝。

參考文獻

- 李善男、劉振發、許義明。1997。經體外成熟和體外受精之牛卵母細胞與卵丘細胞共培養之發育率。中畜會誌 24(4)：429~438。
- 楊鎮榮、黃政齊、謝明江。2001。精子分析儀在山羊精液性狀評估之應用。畜產研究 34(1)：59~68。
- Ball, G. D., M. L. Leibfried, R. W. Lenz, R. L. Ax, B. D. Bavister and N. L. First. 1983. Factors affecting successful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. Biol. Reprod. 28：717~725.
- Bavister, B. D. 1982. Evidence for a role of post-ovulatory cumulus components in supporting fertilizing ability of hamster spermatozoa. J. Andol. 3：365~372.
- Bearden, H. J. and J. W. Fuquay. 1997. Semen Evaluation. In：Applied Animal Reproduction. 4th ed. Pp. 158~170. A Simon and Schuster Company. New Jersey, USA.
- Behalova, E. and T. Greve. 1993. Penetration rate of cumulus-enclosed versus denuded bovine eggs fertilized *in vitro*. Theriogenology 39：186(Abstra.).
- Cheng, F. P., B. M. Gadella, W. F. Voorhout, A. Fazeli, M. M. Bevers and B. Colenbrander. 1998. Progesterone induced acrosome reaction in stallion spermatozoa is mediated by a plasma membrane progesterone receptor. Biol. Reprod. 59：733~742.
- Chian, R. C. and K. Okuda. 1995. Influence of cumulus cells on *in vitro* fertilization of bovine oocytes

- derived from *in vitro* maturation. Anim. Reprod. Sci. 38 : 37~48.
- Cox, J. F. 1991. Effect of the cumulus cells on *in vitro* fertilization of *in vitro* matured cow and sheep oocytes. Theriogenology 35 : 191 (Abstra.).
- Cox, J. F., J. Hormazabal and A. Santa Maria. 1993. Effect of cumulus on *in vitro* fertilization of bovine matured oocytes. Theriogenology 40 : 1259~1267.
- Crozet, N. 1984. Ultrastructural aspects of *in vivo* fertilization in the cow. Gamete Res. 10 : 241~251.
- Fatehi, A. N., E. C. Zeinstra, R. V. Kooij, B. Colenbrander and M. M. Bevers. 2002. Effect of cumulus cell removal of *in vitro* matured bovine oocytes prior to *in vitro* fertilization on subsequent cleavage rate. Theriogenology 57 : 1347~1355.
- Fukui, Y. 1990. Effect of follicle cells on acrosome reaction, fertilization and developmental competence of bovine oocytes matured *in vitro*. Mol. Reprod. Dev. 26 : 40~46.
- Garner, D. L. and L. A. Johnson. 1995. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. Biol. Reprod. 53 : 276~284.
- Glover, F. A. 1968. Physical method of measuring the motility of bull spermatozoa. Nature 219 : 1263~1264.
- Hawk, H. W., N. D. Nel, R. A. Waterman and R. J. Wall. 1992. Investigation of means to improve rates of fertilization *in vitro* matured/*in vitro* fertilized bovine oocytes. Theriogenology 38 : 989~998.
- Itgki, Y. and Y. Toyoda. 1991. Factors affecting fertilization *in vitro* of mouse eggs after removal of cumulus oophorus. J. Mammal. Ova. Res. 8 : 126~134.
- Kikuchi, K., T. Nagai, J. Motlik, Y. Shioya and Y. Izakie. 1993. Effect of follicle cells on *in vitro* fertilization of pig follicular oocytes. Theriogenology 39 : 593~599.
- Legendre, L. M. and J. Stewart-Savage. 1993. Effect of cumulus maturity on sperm penetration in the golden hamster. Biol. Reprod. 49 : 82~88.
- Li, R., R. J. Norman, D. T. Armstrong and R. B. Gilchrist. 2000. Oocyte-secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells. Biol. Reprod. 63 : 839~845.
- Linford, E., F. A. Glover, C. Bishpo and D. L. Stewart. 1976. The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bull. J. Reprod. Fertil. 47 : 283~291.
- Liu, Y., G. R. Holyoak, S. Wang and T. D. Bunch. 1995. The importance of cumulus cells on the *in vitro* production of bovine oocytes. Theriogenology 43 : 267(Abstra.).
- Magier, S., H. H. van der Ven, K. Diedrich and D. Krebs. 1990. Significance of cumulus oophorus in *in-vitro* fertilization and oocyte viability and fertility. Hum. Reprod. 5 : 847~852.
- Mahadevan, M. M. and A. O. Trounson. 1985. Removal of the cumulus oophorus from the human oocyte for *in vitro* fertilization. Fertil. Steril. 43 : 263~267.
- Parrish, J. J., J. Susko-Parrish, M. A. Winer and N. L. First. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. Biol. Reprod. 38 : 1171~1180.
- Schroeder, A. C. and J. J. Eppig. 1984. The developmental capacity of mouse oocytes that matured spontaneously *in vitro* is normal. Dev. Biol. 102 : 493~497.
- Siddiquey, A. K. S. and J. Cohen. 1982. *In vitro* fertilization in the mouse and the relevance of different sperm/egg concentrations and volumes. J. Reprod. Fertil. 66 : 237~242.
- Sirivaidyapong, S., M. M. Bevers and B. Colenbrander. 1999. Acrosome reaction in dog sperm is induced by a membrane-localized progesterone receptor. J. Androl. 20 : 537~544.

- Staigmiller, R. B. and R. M. Moor. 1984. Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside the follicle. *Gamete Res.* 9 : 221~229.
- Tanghe, S., A. Van Soom, H. Nauwynck, M. Coryn and A. de Kruif. 2002. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 61 : 414~424.
- Tanghe, S., A. Van Soom, J. Mehrzad, L. Duchateau, D. Maes and A. de Kruif. 2003. Cumulus contributions during bovine fertilization *in vitro*. *Theriogenology* 60 : 135~149.
- Uhler, M. L., A. Leung, S. Y. W. Chan and C. Wang. 1992. Direct effect of progesterone and antiprogesterone on human sperm hyperactivated motility and acrosome reaction. *Fertil. Steril.* 58 : 1191~1198.
- Van Soom, A., S. Tanghe, I. De Pauw, D. Maes and A. de Kruif. 2002. Function of the cumulus oophorus before and during mammalian fertilization. *Reprod. Domest. Anim.* 37 : 144~151.
- Vanderhyden, B. C. and D. T. Armstrong. 1989. Role of cumulus cells and serum on the *in vitro* maturation, fertilization, and subsequent development of rat oocytes. *Biol. Reprod.* 40 : 720~728.
- Yamazaki, Y., T. Wakayama and R. Yanagimachi. 2001. Contribution of cumulus cells and serum to the maturation of oocyte cytoplasm as revealed by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Zygote* 9 : 277~282.
- Younis, A. I. and B. G. Brackett. 1991. Importance of cumulus cells and insemination interval for development of bovine oocytes into morulae and blastocysts *in vitro*. *Theriogenology* 36 : 11~21.
- Zhang, L., S. Jiang, P. J. Wozniac, X. Yang and R. A. Godke. 1995. Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 40 : 338~344.

Effect of semen quality and cumulus cell removal on the development potential of *in vitro* produced bovine embryo⁽¹⁾

Jen-Wen Shiau⁽²⁾, Yu-Hsin Chen⁽²⁾, Jenn- Rong Yang⁽²⁾, Lee-Ching Tsai⁽²⁾, Feng-Hsiang Chu⁽²⁾, Perng- Chin Shen⁽²⁾, San- Nan Lee⁽³⁾, and Lih- Ren Chen^{(2) (4)}

Received : Nov. 8, 2003 ; Accepted : May. 4, 2004

Abstract

The purpose of this study was to investigate the effect of frozen semen quality and cumulus cells removal on the development potential of the resultant bovine embryos. Trial 1 used the sperm analyzer (HTM IVOS) to determine the frozen-thawed semen quality, including the concentration, motility, progressive movement, and abnormal percentage of sperm, of two bulls imported from USA. The results showed that the concentration, motility, progressive and abnormal percentage of sperm in the frozen-thawed semen from the A and B bulls were 33.5 vs. 37.1 $\times 10^6$ /ml, 40.3 vs. 44.0%, 10.6 vs. 32.0%, 16.3 vs. 7.6%, respectively. The fertilization rate and blastocyst rate of the resultant embryos were 9.7 vs. 46.3% ($P < 0.05$) and 0.4 vs. 5.1% ($P < 0.05$), respectively. Trial 2 was conducted to examine the methods used to remove the cumulus cells prior to *in vitro* fertilization (IVF). *In vitro* matured cumulus-oocyte complexes(COCs) were randomly divided into four groups. In group 1 and 2, cumulus cells of the COCs were partially or totally removed with glass micropipette; in group 3 and 4, they were treated with hyaluronidase prior to remove the cumulus cells partially or totally with glass micropipette. The cleavage rate and blastocyst rate of the embryos in group 1, 2, 3 and 4 were 46.7 vs. 10.7%、35.5 vs. 4.3%、39.9 vs. 10.1%、30.7 vs. 3.3%, respectively. In conclusion, the good bull semen quality for IVF and partial removal of cumulus cells of COCs before IVF will benefit the production of bovine embryos *in vitro*.

Key words : Semen quality, Bovine embryos, COCs, IVF.

-
- (1) Contribution No.1231 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.
(2) Animal Physiology Division, COA-LRI, Hsinhua, Tainan 712, Taiwan, R.O.C.
(3) Deputy Director Office, COA-LRI, Hsinhua, Tainan, Taiwan, R.O.C..
(4) Corresponding author.