



奶山羊胚胎无创回收技术的研究与应用探索

赵霞¹, 于聪祥², 张春华¹, 赛音¹, 贾致远¹, 爱伦高娃^{2*}, 道楞³

(1. 内蒙古自治区农牧业科学院, 内蒙古呼和浩特 010031; 2. 内蒙古自治区医科大学附属医院, 内蒙古呼和浩特 010017; 3. 内蒙古自治区农牧业技术推广中心, 内蒙古呼和浩特 010010)

摘要:本研究评估了不同给药途径(静脉注射与阴道内注射)对奶山羊胚胎无创回收效率的影响。通过注射苯甲酸雌二醇和催产素, 成功促进了母羊子宫颈的松弛、扩张和子宫收缩, 为胚胎回收创造了理想条件。在发情后 6.5 至 7 d, 采用经宫颈手术方式收集胚胎, 并通过站立式保定架和严格的术前准备确保手术安全。实验结果显示, 两种给药途径均表现出较高的胚胎回收率(平均 93.75% 至 100%)和液体回收效率(平均 96.28% 至 96.75%), 同时回收的胚胎数量平均达到 5.0 至 5.6 枚, 显示出良好的胚胎质量和数量。值得注意的是, 阴道给药组取得了 100% 的回收率, 显著优于静脉给药组。本研究为非手术经宫颈胚胎回收技术提供了有力数据支持, 为畜牧业高效、安全的胚胎回收提供了重要参考, 有助于推动畜牧业的持续发展和进步。

关键词:奶山羊; 胚胎无创回收; 给药途径

[中图分类号] S813.23

[文献标志码] A

[文章编号] 1004-6704(2024)-06-0103-05

Research and Application Exploration of Non-invasive Recovery Technology of Dairy Goat Embryos

ZHAO Xia¹, YU Congxiang², ZHANG Chunhua¹, SAI Yin¹, JIA Zhiyuan¹, Ailungaowa^{2*}, DAO Leng³

(1. Inner Mongolia Academy of Agriculture and Animal Husbandry, Hohhot, Inner Mongolia 010031, China; 2. Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot, Inner Mongolia 010017, China; 3. Inner Mongolia Autonomous Region Agriculture and Animal Husbandry Technology Extension Center, Hohhot, Inner Mongolia 010010, China)

Abstract: This study focused on the application of non-invasive transcervical embryo recovery technology in ewes, and evaluated the effect of different administration methods on the recovery efficiency. Cervical relaxation, expansion and uterine contraction in female sheep were achieved by injecting estradiol benzoate and oxytocin, creating ideal conditions for embryo recovery. From 6.5 to 7 days after estrus, embryos were collected by cervical surgery using standing stand and strict preoperative preparation. The experimental results showed that the embryo recovery rate (93.75% and 100%) and the fluid recovery efficiency (96.28% and 96.75%) achieved high success rates, and the average number of recovered embryos also showed good levels (5.0 and 5.6). This study provides powerful data for the transcervical non-surgical embryo recovery technology, and has an important reference value for the efficient and safe embryo recovery in animal husbandry.

Key words: milk goat; non-invasive recovery of embryos; route of administration

[收稿日期] 2024-06-18

[基金项目] 内蒙古农牧业创新基金项目(2023CXJIM04); 内蒙古自治区科技计划项目(2021GG0067); 农牧业科技转化资金项目(2024TG13-3)

[第一作者] 赵霞(1968-), 女, 研究员, 主要从事繁殖技术研究推广的工作。E-mail: zxgege@163.com

[共同第一作者] 道楞(1990-), 女, 畜牧师, 主要从事畜牧技术推广工作。E-mail: tnaq@sina.cn

*[通信作者] 爱伦高娃, E-mail: airuka@outlook.com

奶山羊作为畜牧业中的重要经济动物, 其繁殖效率和遗传品质的优化对于整个产业的可持续发展至关重要。传统胚胎回收技术虽提升了繁殖效率, 但手术过程中的创伤与应激反应成为制约其进一步发展的主要瓶颈。因此, 随着科技的进步, 无创胚胎

回收技术凭借其高效、安全的特点,受到了业界的广泛关注。

无创胚胎回收技术^[1-2],特别是在奶山羊上的应用,已成为当前国际研究的热点。该技术通过非侵入性的方式,如超声波引导下的细针穿刺^[3],实现对奶山羊卵巢中卵泡和胚胎的精准采集。这种方法显著减少了手术对母体的创伤和应激反应,确保了胚胎的质量与移植成功率。该技术不仅提高了胚胎移植后的存活率和怀孕率,还结合了胚胎性别鉴定与遗传标记分析,为精准筛选遗传个体、优化奶山羊种群品质提供了可能。

在欧洲等发达国家和地区,无创胚胎回收技术已广泛应用于奶山羊胚胎的收集与移植环节,显著提升了奶山羊的繁殖效率与生产潜能。此外,该技术还在生物医学领域得到了拓展应用,如胚胎发育机理研究、疾病模型构建及药物筛选等,为科研工作者提供了全新的研究工具与视角。

在无创胚胎回收技术中,子宫颈处理方法是一个关键环节。它涉及到胚胎采集和植入的顺利进行,对胚胎的存活率和移植成功率具有重要影响。已有许多研究团队对子宫颈处理方法进行了深入的探索和实践,如 Fonseca 等^[4]的研究不仅验证了无创胚胎转移技术的优势,还着重分析了子宫颈处理方法在胚胎采集和植入过程中的关键作用。这些研究为我们提供了宝贵的参考和经验,对于推动无创胚胎回收技术的进一步发展具有重要的指导意义。然而,尽管无创胚胎回收技术已经取得了显著的进展,但在实际应用中仍面临一些技术挑战。特别是在羊阴道回收胚胎或子宫颈处理方面,仍需进一步的研究和优化^[5]。因此,本文将进一步探讨奶山羊无创胚胎回收技术中的子宫颈处理方法,以期对相关领域的研究和实践提供更为全面和深入的参考。我们期望通过综合分析现有研究成果和实践经验,为无创胚胎回收技术的优化和升级提供新的思路和方向,从而推动畜牧业的持续发展和进步。

1 实验材料

1.1 实验药品及设备

实验药品:FSH(西班牙产,500 IU/瓶)、CIDR(新西兰产,40 mg)、PMSG(三生制药生产,1 000 IU/支)、冲卵液(美国产,1 000 mL)、催产素(上海瀚香生物科技有限公司)、前列烯醇(上海源叶生物科技有限公司)、2%利多卡因、苯甲酸雌二醇(上海通用药业股份有限公司)

实验设备:奥林帕斯实体显微镜、各种规格培养

皿、冲洗导管(自制)、各种规格 Allis forceps(26 cm)、Hegar 宫颈扩张器、Collin 窥镜(型号 1-3)、B 超仪(深圳迈瑞)、自制羊保定架。

1.2 实验动物及条件

在繁殖季节(8月),选取了 24 只健康、高产且体重在 68~72 kg 的经产奶山羊作为实验对象。所有试验羊均采取舍饲圈养方式,每日定时投喂两次草料,并额外补充 200~300 g 含 16%粗蛋白质的浓缩料,自由饮水和摄取矿盐。在试验开始前,所有试验羊均经过超声检查(检查内容包括卵巢囊肿、子宫内膜炎以及卵巢、子宫和宫颈周围的回声肿块等)及临床评估(评估项目涵盖乳腺炎、阴道分泌物检查、充血及阴道水肿等方面),确保仅采用未发现异常的母羊进行实验。此外,在实验开始前,所有母羊均未接受过基于任何类型的宫颈形态评估。

2 实验方法

2.1 超声波评估

在撤栓前 60 h(即开始注射 FSH 进行超数排卵时),以及在非手术冲胚前 12~16 h,使用便携式 B 超仪搭配 7.5 MHz 直肠探头对所有供体羊进行卵巢超声波检查。这项检查的目的在于精确评估供体羊的卵泡发育状况,进而确定其是否有效进行超数排卵,为后续操作提供科学依据。

2.2 供体羊的超数排卵处理

试验选取 24 只健康的奶山羊,依据发情后处理方式的不同分为两组进行实验。随机选定一天,对供体羊放置孕酮阴道栓。自放栓第 7 天起,进行超排处理,根据供体羊的个体差异,采用常规递减注射法,在连续 3 d 的上午和下午进行 FSH 肌肉注射,FSH 的总量控制在 8~14 mL。在超排处理的第 3 天上午,进行第五次 FSH 注射并撤栓,随即肌肉注射 PMSG 200 IU。当日,分别于上午和下午注射 PG 1 mL。撤栓后的傍晚,即在第 6 次 FSH 注射前,使用试情公羊进行试情。供体羊出现发情反应,停止注射第六针,并详细记录发情时间,以此作为发情开始的 0 d 标记。

2.3 供体羊的试情与配种

取栓后 12~14 h 开始早晚两次试情,观察供体羊的发情状况。对发情羊只进行标记并记录发情时间。输精前 24 h 起,对供体羊进行空腹以确保手术时的最佳生理状态。

精液处理:从经过选择的优质奶山羊种公羊采集新鲜精液,经显微镜检查需确保活力、数量和形态达标;为提高精子的生存能力和便于操作,使用特定

的稀释液对精液进行稀释处理。在稀释过程中,我们严格控制温度,确保精液保持在最适宜的温度下。

奶山羊的腹腔镜输精:按 1 mL/50 kg 体重计算,通过硬膜外注射 2%利多卡因对奶山羊进行轻度麻醉,利用腹腔镜技术观察其卵巢和子宫角情况,通过特定的输精器将稀释后的精液精准地注入子宫角内。

2.4 分组处理与给药方式

根据奶山羊的发情观察结果,将试验母羊随机分为两个试验组:阴道给药组和静脉给药组。阴道给药组采取了创新的阴道内直接注射方式给予催产素;而静脉给药组则通过静脉注射的方式将催产素注入母羊的血液循环中。这种分组和给药方式旨在探究不同给药途径对母羊发情及受孕效果的影响。

2.5 胚胎的回收

2.5.1 手术前的扩宫处理 在胚胎回收手术前 12~16 h,所有供体注射 1 mg 的苯甲酸雌二醇(雌激素),以促进子宫颈的松弛和扩。在胚胎无创回收手术开始前 20 min,对所有母羊给予 50~100 IU 的催产素,以促进子宫收缩,便于胚胎的顺利回收。随后,严格按照标准的无创回收胚胎操作程序进行胚胎回收手术,确保手术过程的无菌操作和安全进行。实验设计见图 1。

2.5.2 胚胎的无创回收方法 发情后的第 6.5~7 天,我们采用经宫颈手术方式收集胚胎,以确保操作的高效性与安全性。在此过程中,母羊以站立式被

稳妥地固定在专业设计的保定架上。术前准备阶段,我们对母羊会阴区域进行严格的清洁和消毒,剃除尾巴附近毛发,并使用清水与专用洗涤剂仔细清洗,以清除手术区域的所有杂质,特别是肛门及外阴处的粪便残留,从而确保手术环境的无菌与安全。

在子宫冲洗前 20~30 min,按 1 mL/50 kg 体重计算,通过硬膜外注射 2%利多卡因时,以减轻母羊在手术过程中的应激反应和疼痛感。随后,我们轻柔地将专业的 Collin 窥镜(型号 1-3)插入阴道内,以便准确观察宫颈开口情况。为确保操作的稳定性,我们采用特制的宫颈钳精准地固定在宫颈下方,并使用无菌纱布进行必要的擦拭准备。在冲胚过程中,采用经直肠指触法,将冲洗导管精准地放置于目标子宫角内。为防止冲洗液外溢,我们使用特制架子抬高母羊的后躯。冲洗导管连接至专用的灌注系统,我们使用 50 mL 注射器,每次精确注入约 10 mL 的冲洗液。通过精确控制阀门,我们确保冲洗液完全注入并有效排出残留物。

我们使用 200 mL 冲胚液对两个子宫角进行彻底的冲洗。术后,谨慎移除所有器械,确保不对子宫造成任何损伤。

2.6 胚胎鉴定

离心分离:回收液在精确控制的 700~800 g 离心力下进行离心处理,持续时间为 7~8 min,以确保胚胎与混杂的杂质有效分离,从而实现胚胎样本的纯化。

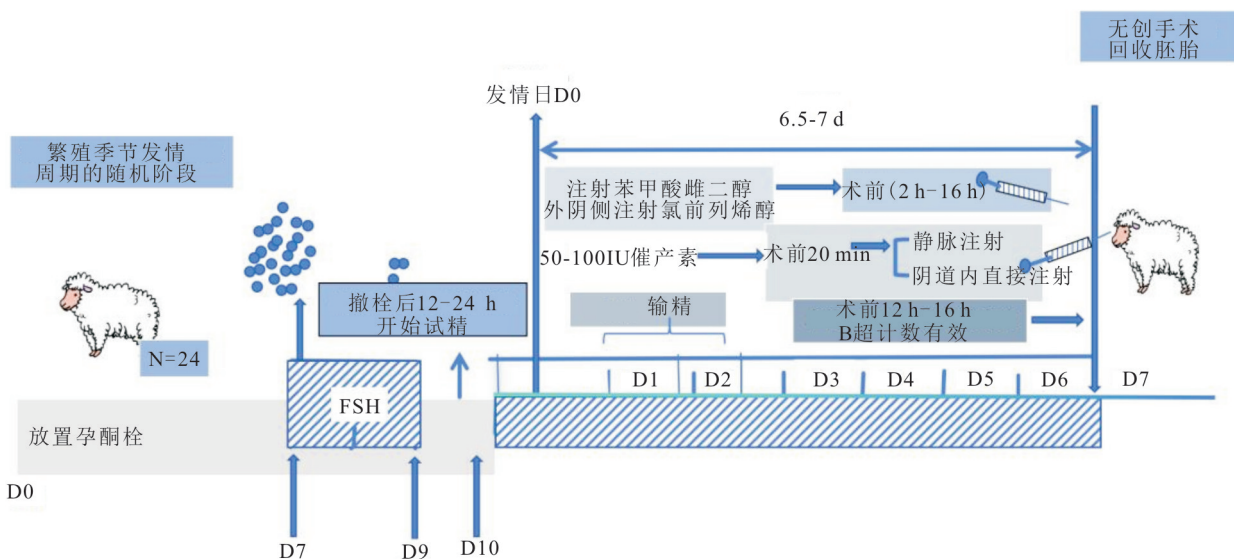


图 1 实验设计图

Fig. 1 Experimental design diagram

显微观察与评估:采用高分辨率实体显微镜对离心纯化后的胚胎进行细致观察,主要观察胚胎的形态学特征与内部结构。依据国际公认的胚胎质量分级标准,综合评估胚胎的细胞总数、细胞分裂的均匀性(即细胞分裂的同步性与形态对称性)以及碎片的数量与分布情况。基于这些评估标准,将胚胎划分为 A、B、C、D 四个等级,其中 A 级胚胎代表最高质量,具有最佳的细胞分裂状态、最少的碎片及最高的发育潜力;而 D 级胚胎则表现出较低的发育能力与较高的碎片化程度。

2.7 统计分析

本研究对实验结果进行了系统的统计分析。我们采用了卡方检验方法。在所有统计分析中,我们以 P 研究对实验作为显著性水平的判定标准,认为 $P \leq 0.05$ 时,结果具有统计学上的显著性意义。

3 结果与分析

3.1 实验结果

在本项研究中,我们采用了两组共计 24 只试验羊进行对照试验,以探究不同给药途径对胚胎无创回收的影响。一组羊通过静脉注射途径给予催产素,另一组则通过阴道穹窿进行阴道内注射给药。为确保研究的科学性与统计效果达到最高标准,我们在设计试验时,确保每组均纳入 12 只试验羊作为样本量,以此增加数据的代表性和可信度。此外,为进一步验证试验结果的稳定性和可靠性,我们在初次试验完成后的 45 d 进行了重复试验^[6]。在试验开始前,所有试验羊均接受了统一的处理流程,实验结果见表 1。

本研究旨在通过对比静脉注射与阴道内注射两种给药途径在奶山羊胚胎无创回收技术中的应用效果,以优化该技术的操作流程和成功率。实验结果数据显示,两种给药途径在子宫冲洗过程的持续时间、成功数/总数、流体回收效率以及平均回收胚胎

数等方面呈现出一定的差异和规律。

3.1.1 胚胎回收成功率 静脉注射组共有 24 只供体羊,成功回收胚胎的有 19 只,成功率为 79.17%。阴道内注射组同样有 24 只供体羊,成功回收胚胎的有 24 只,成功率为 100%。卡方检验结果显示,不同给药途径对胚胎回收成功率具有显著影响($P < 0.05$),阴道内注射组成功率显著高于静脉注射组。

3.1.2 子宫冲洗过程持续时间 静脉注射组平均持续时间为 28.9 min。阴道内注射组平均持续时间为 26.95 min。尽管差异不显著,但阴道内注射组时间略短,可能反映其对冲洗操作效率的不同影响。

3.1.3 液体回收效率 静脉注射组液体回收效率为 95.45%。阴道内注射组液体回收效率为 96.75%。两组均表现出高液体回收效率,有助于减少胚胎损失。

3.1.4 平均回收胚胎数 静脉注射组平均回收胚胎数为 5 枚。阴道内注射组平均回收胚胎数为 5.6 枚。阴道内注射组略高于静脉注射组,但差异不显著。

4 讨论

本研究系统评估了催产素在阴道内注射与静脉注射两种给药方式下,对奶山羊胚胎无创回收效果的差异,并特别关注了阴道内注射催产素联合苯甲酸雌二醇这一创新方法的应用。实验结果显示,阴道内给药途径在胚胎回收方面具有显著优势。阴道内注射组实现了 100% 的胚胎回收成功率,远超静脉注射组的 79.17%。这一成就归因于阴道内注射直接作用于生殖道,催产素有效促进了宫颈松弛和子宫蠕动,为胚胎回收创造了优越条件。苯甲酸雌二醇的联合使用进一步强化了这一效果,使宫颈更加松弛,子宫活动更为频繁,从而显著提升了胚胎回收的效率和成功率。

表 1 供体羊胚胎无创回收实验数据汇总表

Table 1 Summary table of experimental data on non-invasive recovery of donor sheep embryos

序号	给药途径	总数 /只	子宫冲洗过程 的持续时间	成功数 /只	液体回收效率 /%	平均回收胚胎 /枚
1-1	静脉注射	12	29.5	9	94.5	4.8
1-2	静脉注射	12	28.3	10	96.4	5.2
2-1	阴道内注射	12	27.5	12	96.3	5.4
2-2	阴道内注射	12	26.4	12	97.2	5.8
	合计		48	43	95.65	5.3

子宫冲洗与液体回收的优化:尽管在子宫冲洗持续时间和液体回收效率上,两组差异未达统计学显著水平,但阴道内注射组均表现出轻微优势。这提示了未来在优化胚胎回收技术时,通过调整给药方式可能进一步提升冲洗效率并缩短操作时间。

动物福利与环境保护:阴道内给药不仅简化了操作过程,还显著降低了动物的应激反应,提升动物福利水平优化胚胎回收技术方面展现出巨大潜力^[7-8]。此外,该给药方式减少了药物在体内的代谢与排泄,降低了环境负担,符合绿色可持续发展的原则。

研究局限与未来方向:当前研究仍存在一定局限性,受限于样本量和重复次数,未来需扩大样本、增加实验次数以增强结果的普适性和稳定性。同时,应考虑母羊品种、环境条件及操作技术等因素对胚胎回收效果的影响。深入探究给药途径对子宫生理环境的具体影响、催产素与苯甲酸雌二醇的作用机制,以及技术操作流程的优化,将为该技术的广泛应用提供坚实科学基础^[9]。

在羊胚胎回收技术中,我们创新性地采用阴道内给药苯甲酸雌二醇^[10],显著提高了胚胎回收的成功率和效率。这一技术革新不仅简化了操作流程,降低了动物应激,还对提升动物福利具有重要意义^[11]。但关于羊发情周期及黄体期宫颈松弛机制的研究仍显不足,未来研究应聚焦于给药途径对子宫生理环境的影响,为该领域提供全面理论支撑。

综上所述,阴道内给药途径结合催产素与苯甲酸雌二醇在奶山羊胚胎无创回收中展现出巨大潜力,不仅简化了操作、降低了动物应激、提升了动物福利,还促进了畜牧业的绿色可持续发展,为解决食品安全、动物福利及伦理问题提供了新思路。随着研究的深入和技术完善,该技术有望在更广泛领域内得到应用和推广。

参考文献:

- [1] FONSECA J F, OLIVEIRA M E F, BRANDÃO F Z, et al. Non-surgical embryo transfer in goats and sheep: The Brazilian experience [J]. *Reproduction, Fertility and Development*, 2019, 31(1): 17.
- [2] FONSECA J F, ZAMBRINI F N, ALVIM G P, et al. Embryo production and recovery in goats by non-surgical transcervical technique [J]. *Small Ruminant Research*, 2013, 111(1-3): 96-99.
- [3] FONSECA J F, SOUZA-FABIAN J M G, OLIVEIRA M E F, et al. Nonsurgical embryo recovery and transfer in sheep and goats [J]. *Theriogenology*, 2016, 86(1): 144-151.
- [4] FONSECA J F, ZAMBRINI F N, GUIMARÃES J D. Non-surgical embryo recovery and transfer in sheep: Current status and future perspectives [J]. *Animal Reproduction Science*, 2019, 207: 106-136.
- [5] DOS SANTOS V M B, PINTO P H N, BALARO M F A, et al. Use of oxytocin to attain cervical dilation for transcervical embryo transfer in sheep [J]. *Reproduction in Domestic Animals Zuchthygiene*, 2020, 55(10): 1 446-1 454.
- [6] CANDAPPA I B R, BARTLEWSKI P M. Advances in embryo transfer techniques in sheep and goats: A review [J]. *Animal Reproduction Science*, 2020, 218: 106 478.
- [7] CANDAPPA I B R. A review of advances in artificial insemination (AI) and embryo transfer (ET) in sheep, with the special reference to hormonal induction of cervical dilation and its implications for controlled animal reproduction and surgical techniques [J]. *The Open Reproductive Science Journal*, 2011, 3(1): 162-175.
- [8] GUSMÃO A L, SILVA J, QUINTELA A, et al. Colheita transcervical de embriões ovinos da raça Santa inês no semi-árido nordestino [J]. *Revista Brasileira Saúde Produção Animal*, 2007, 8: 1-10.
- [9] PERRY K, HARESIGN W, WATHES D C, et al. Intracervical application of hyaluronan improves cervical relaxation in the ewe [J]. *Theriogenology*, 2010, 74(9): 1 685-1 690.
- [10] KAABI M, ALVAREZ M, ANEL E, et al. Influence of breed and age on morphometry and depth of inseminating catheter penetration in the ewe cervix: A postmortem study [J]. *Theriogenology*, 2006, 66(8): 1 876-1 883.
- [11] CANDAPPA I B R, BARTLEWSKI P M. Induction of cervical dilation for transcervical embryo transfer in ewes [J]. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2014, 12: 8.