



犬繁殖调控技术研究进展

董佳涵¹, 朱淑文²

(1. 上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240; 2. 上海市兽医生物技术重点实验室, 上海 200240)

【摘要】 由于犬具有一些独特的生殖生理特点, 使犬的繁殖调控技术的发展一直面临着一些困难。目前犬繁殖调控技术的研究远远落后于其他哺乳动物。本文综述了犬诱导发情、精液保存、人工受精、胚胎移植及克隆等犬的繁殖调控技术国内外研究进展。

【关键词】 犬; 诱导发情; 精液保存; 人工受精; 胚胎移植; 克隆

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)02-0074-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.02.17

Current Status and Progress in Canine Reproductive Regulation Technology

DONG Jia-han¹, ZHU Shu-wen²

(1. School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China;

2. Shanghai Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Shanghai 200240)

【Abstract】 Currently, studies on canine reproductive regulation technology are far less developed than that in other mammals. Compared with other mammals, canine reproductive physiology has unique characteristics which make canine reproductive biotechnology faced with some difficulties. This review summaries the following aspects, including induction of estrus in dogs, preservation of semen and artificial insemination (AI), embryo transfer (ET) and clone, and discusses its current progress and prospect.

【Key words】 Canine; Induction, estrus; Preservation, semen; Artificial insemination; Embryo transfer; Clone

2005年底公布的犬全基因组图谱显示, 犬与人的基因相似度比人与鼠高, 犬作为研究人类遗传疾病的动物模型具有很大的潜力, 目前是国内外学者研究的热点。因此在这种背景下, 犬的繁殖生物技术也进入了快速发展阶段。但是由于犬具有一些独特的生殖生理特点, 使犬繁殖控制技术的发展目前仍然面临着一些困难, 如诱导发情、精液冷冻保存及人工授精 (artificial insemination, AI)、胚胎移植 (embryo transfer, ET)、体外受精 (in vitro fertilization, IVF) 等胚胎体外生产技术以及克隆 (clone) 等, 这些技术的应用不仅能够提高良种犬繁

殖潜能, 保护犬的种质资源, 对犬作为实验动物的基础研究具有重要促进作用。

1 诱导发情

与一般家畜相比, 犬虽是季节性发情动物, 但是具有一个相对较长的发情周期, 其持续时间大约相当于其它大家畜的10倍, 除此之外, 犬的生殖活动和繁殖率也具有一定的不稳定性, 交配妊娠率有较大的差别。由于犬的间情期黄体寿命与妊娠期的一样长, 因此犬经常会出现假孕现象^[1]。

犬一般在出生后10~12个月开始表现性行为,

[作者简介] 董佳涵(1986-), 女, 硕士在读, 研究方向: 动物繁殖生物技术。E-mail: dongjiahan@126.com。

[通讯作者] 朱淑文(1960-), 女, 副教授, 研究方向: 动物繁殖生物技术。E-mail: swzhu@sjtu.edu.cn。

大多数犬约每年发情 2 次,发情期所持续时间为一周左右,每次间隔约为半年。发情期的间隔长短因品种个体、营养状况不同而有较大差异。据统计家养犬 1 年只发情 1 次的占 26.1%,发情两次的占 65.2%,发情 3 次的占 8.7%^[2]。母犬的发情周期表现受体内生殖激素的变化所调控,在进入发情期前体内雌激素水平明显升高,持续约 7 d 后,开始下降,孕激素水平较低;而此时 LH 水平急剧升高,持续时间较短,当 LH 达峰值后 24~48 h,开始排卵,雌激素水平后降至正常值^[3]。

母犬到了性成熟年龄后和配种季节到来后仍未见发情,可采用激素诱导发情。目前在国内外应用于诱导母犬发情的外源性激素大致分为以下几类:促性腺激素释放激素(GnRH)、促性腺激素、促乳素抑制因子(PIF)、雌激素(E2)、前列腺素(PGF_{2α})、多巴胺激动剂等。国外对激素类药物诱导犬发情的研究较早,从 1939 年开始以来,已经有超过 40 种的激素类处理组方用于诱导犬的发情^[4]。Ithaca^[5]指出,只有当母犬卵巢上的卵泡发育到一定的水平时,对母犬给予 GnRH 才会有效,GnRH 并不能增加生长卵泡的数目,只能促使其成熟的卵泡排卵。GnRH 的脉冲释放和阈值对于卵泡的持续生长和发育具有很重要的意义。因此应用 GnRH 及其类似物诱导发情时,必须要有连续滴注药或规律频繁给或将其制作成缓释制剂进行皮下埋植。利用 GnRH 来诱导乏情母犬发情,其处理时间一定要超过 8 d 才会出现效果^[6]。

国内,余道伦等^[7]等实验表明,小剂量的妊娠马血清促性腺激素(PMSG)(150~300)IU 单独使用时不能有效地诱导发情母犬的发情排卵,大剂量(500)IU 应用时虽可有效地诱导发情排卵,但受胎率较低,因此提高单独应用 PMSG 的诱导发情效果尚需进一步研究。王禄华等^[8]将 6 只试验犬在第 1 天皮下注射 PGF_{2α} 0.5 mg,分上、下午两次注射 24 h 后皮下注射 PMSG 20 IU/kg 体重,每天 1 次,连用 10 d,交配后肌肉或皮下注射促排 3 号 24 h 后复配 1 次。结果表明试验犬都出现了发情症状,发情率为 100%,但受配率较低。在生产中,经常用 hCG 与 PMSG 结合使用,诱导处于乏情期的母犬发情,且上述两种激素联合使用要比单独使用 PMSG 诱导发情的效果好的多^[9]。张玉西等^[10]研究,用相同 PMSG 和 hCG 配合处理母犬,发现在发情率、受胎率方面经产母犬显著优于未经产犬。谭建华等^[11]用

PGF_{2α}、eCG 及 hCG 联合使用具有促进发情、卵泡发育和超数排卵的功能,并能维持早期胚胎的着床。孙兆增等^[12]将 40 只处于乏情期的比格犬乙烯雌酚隔天给药且药量逐渐加大的方法诱导发情的效果较好。李小慧等^[13]利用溴隐亭诱导母犬发情,将所有的试验犬每天口服溴隐亭 1 次,结果表明在试验所用的 9 只犬中,有 3 只苏北红犬出现发情症状,而另外 6 只罗维纳犬中,只有 1 只在处理后出现发情症状,经分析,出现差异的原因可能与犬的种类和繁殖史有关系。

目前对于激素诱导犬发情的效果不一致,还没有可用于生产及临床上的合适组方,存在一定的问题。使用 PMSG 组合对乏情母犬进行人工诱导发情是最有效的方法,但用 PMSG 诱导发情的最大缺点是容易使卵巢产生不排卵的大卵泡并且由于 PMSG 半衰期长,诱情失败后会导致母犬长时间不发情,甚至丧失繁殖力。使用雌激素的方法,由于注射雌激素对于卵泡发育的促进作用较小,容易导致母犬出现假发情,并且雌激素的副作用常会影响母犬的正常性周期。使用前列腺素类药物时会产生一些副作用,如口水增多、呕吐、腹泻、运动失调、不安、尿频等。

2 精液保存

1959 年 Seager 首次报道了犬的冻精人工授精获得成功。之后,犬精液冷冻已成为犬生殖生理学研究的一部分,相继建立了采精、精液品质评价、稀释及人工授精的有关参数,最高受孕率可达 92%。国外一些大学和养犬俱乐部建立了犬精子库,提供繁殖配种服务。我国在这方面的研究起步较晚,目前尚处于试验研究阶段。

Rota 等通过添加 Equex STM 到常用的 Tris 卵黄液中,提高了在 38℃ 解冻后犬精子的存活率,经阴道或子宫内输精,妊娠率达到了 84%^[14]。Abe 等^[15]用脱脂牛奶、葡萄糖和甘油代替卵黄液,结果表明解冻后精子的活力及各参数与传统的卵黄液方法无明显差别,且对 2 只受体犬进行人工受精后,产下 6 只幼犬。Bencharif 等^[16]研究用含有 6% 卵黄的低密度脂蛋白冷冻液与传统的含有 20% 卵黄的冷冻液进行比较研究,发现在低密度脂蛋白冷冻液中精子的活力以及在冷冻与解冻的过程中对精子的保护力都比传统的冷冻液好。用此精液对 6 只受体犬进行子宫内人工受精获得 100% 怀孕率。

3 人工受精

开展犬的人工授精对于充分发挥优秀种公犬的作用,提高繁殖效率具有重要意义。早在 1880 年,意大利生理学家 Spallanzani 首次用犬进行 AI 试验取得成功并产下 3 只小狗。

犬宫腔内进行冷冻精液人工受精比阴道内人工授精产仔率高,犬在适当的时间进行人工受精的产仔率为 78% ($n = 559; P < 0.01$),同胎产仔数约为 5.8 ± 0.2 ($P < 0.05$);进行两次人工受精的产仔数和平均同胎产仔数均大于只授精一次;受体犬大于 6 岁比年轻犬产仔率低;另外精液的品质也影响产仔率^[17]。Pretzer^[18]采用冷冻精液进行子宫颈内人工授精,怀孕率为 89.4%、产仔率为 87.5% 及同胎产仔数为 6.9 ± 2.7 ,均好于之前的研究结果。Kim^[19]等采用冷冻精液对犬分别进行子宫腔内人工授精及阴道内授精,结果表明,子宫腔内人工授精怀孕率为 100% 而阴道内仅为 20%。上述报道表明目前子宫腔内人工授精效果较阴道内效果好。

选择最适时间进行人工授精对受精效率有重要影响。犬在促黄体素峰值之后 24 ~ 28 h 卵巢排卵,此时孕酮浓度为 2.12 ~ 4.06 ng/mL,平均浓度: 2.78 ng/mL;孕酮在排卵前浓度为 0.8 ~ 1.56 ng/mL,平均 1.12 ng/mL;在排卵后浓度 1.88 ~ 2.81 ng/mL,平均 2.34 ng/mL;在孕酮浓度为 2.5 ~ 10 nmol/L 即 LH 高峰之后第 3 天进行第 1 次冷冻精液人工受精,第 5 天进行第 2 次冷冻精液人工受精效果较好^[20]。Shimatsu 等^[21]研究发现在 LH 峰值之后的 3 ~ 7 d 进行自然交配可以得到较满意的产仔率及同胎产仔数,但是在 LH 之后第 7 天进行交配的母犬妊娠时间明显长于在 LH 之后第 3 天和第 5 天进行交配的妊娠时间。Tsutsui^[22]在研究自然交配的母犬时发现,子宫颈在排卵后的平均第 5 天关闭,在开始排卵之后的第 6、7、8、9 天进行子宫颈内鲜精人工授精,怀孕率分别为 100%, 71.4%, 37.5% 和 0%。此结果证实卵母细胞在成熟之后的 4 ~ 5 d 进行子宫内人工受精效果最好。

4 胚胎移植

犬的胚胎移植技术目前仅在实验室研究阶段,还没有可用于生产上的成熟技术。这主要是由于诱导犬的同期发情、胚胎体外培养及胚胎移植技术等还不成熟,但是相关的研究一直在进行,目前已

经取得了一定进展^[23]。Kinney 等报道将 8 个桑椹胚植入受体犬的子宫后产下 2 只幼仔。Tsutsui 等报道手术采集发情后 14 ~ 15 d 的 5 只供体犬 28 枚胚胎,将这些胚胎再分别植入 5 只自然发情母犬子宫内,其中有 2 只受体犬受孕,各自产下 2 只幼仔。

Tsutsui 等^[24]认为犬的胚胎移植受超数排卵和同期发情的限制成功率较低,并且比较了子宫切除法与手术冲卵法这两种冲胚方式的胚胎回收率,前一种方法显著高于后一种(97.1% 和 42.5%)且用于早期胚胎移植的胚胎应从输卵管中冲卵获得,输卵管切除术比输卵管冲卵获得率高(95% 和 28.2%)。Tsutsui 等^[25]将犬原核期至 8 细胞期的早期胚胎移入输卵管下游获得成功,表明犬的输卵管胚胎移植是可以实现的。采用自然同期发情的 10 只供体犬及 13 只受体犬进行子宫内早期胚胎移植,供体犬在交配后 1 ~ 4 d(排卵后 5 ~ 7 d)输卵管切除回收早期胚胎;在排卵之后的第 5 天(交配后的 1 ~ 2 d)收集到的是原核期和 2 细胞期胚胎;第 6 天(交配后的 1 ~ 4 d)收集到的是 4 细胞期及 8 细胞期胚胎;排卵之后的第 7 天收集到 8 细胞期胚胎。在受体中有一只接受了 2 个原核期胚胎及一个 2-细胞期胚胎的犬产下俩只幼犬^[26],结果显示虽然子宫内移入早期胚胎可以得到幼犬但成功率较低,早期胚胎移植输卵管中较适合。Jang 等^[27]报道通过耳皮肤成纤维细胞进行体细胞核移植,采用排卵后 72 h 体内成熟卵母细胞,重组后的克隆胚胎移入自然同步发情(排卵后 72 h)受体母犬输卵管中,最后获得了雌性幼犬。董君艳等^[28]也报道将供体胚胎冲出后移植给 2 只自然发情受体犬成功受孕,并产下 3 只幼仔。余道伦等^[29]对自然发情同步配种的供体毕格犬输卵管冲卵,受体毕格犬输卵管鲜胚移植,结果表明,在 8 头受体犬中有 1 头犬于手术后成功怀孕并顺利产下 1 头雄性幼犬,这是国内首次获得输卵管胚胎移植成活幼犬。孙秀青等^[30]进行了犬的输卵管和子宫角胚胎移植,结果在 8 只输卵管胚胎受体犬移植中有 1 只犬于手术后成功怀孕并顺利产下 1 头雄性幼犬,子宫角回收法的胚胎回收率稍低于输卵管回收法。

测定母犬的排卵时间是解决和提高受精率的一个重大问题。它包括了测定正常交配时间和实施 AI 的准确时间,也包括了何时可以收获犬的卵子,以便进行体外受精或是直接收获胚胎进行胚胎移植等。Abe 等^[31]对拉布拉多犬研究发现,在 LH

峰值后的 11 d 发育的胚胎开始从输卵管向子宫内移动,并且在 24 h 内完成,在 LH 峰值后的 13 d 所有胚胎都进入子宫内并且开始着床,在 11~13 d 中发育成桑葚胚,在 14 d 内发育成囊胚。

5 克隆

犬的克隆技术一直面临着两大难题,一是体外获得成熟卵母细胞难度很大,犬的卵母细胞体外成熟培养率很低,这是因为犬的排卵发生在第一次减数分裂开始时,卵子要在输卵管经 1~3 d 发育才至成熟。二是犬的诱导发情技术还不完善,获得同期发情的供受体难度较大。因此直到 2005 年才获得世界上首例克隆犬,科学家们采用的是获得体内成熟卵母细胞及选择自然发情的代孕母犬,将 1095 个胚胎植入 123 头犬体内,有 3 个成功受孕,其中一个流产,另 1 头小犬出生 22 d 后因肺炎死亡,最终一只代孕的拉布拉多猎犬于 60 d 后产下一头小猎犬^[32]。Hong 等^[33]采用犬胎儿成纤维细胞作为核供体进行体细胞核移植,将 50 个重组胚移入自然发情的供体母犬体内,最终获得 2 只体细胞克隆幼犬。Hossein 等^[34]研究受体犬获得重组胚胎数对克隆犬出生率的影响发现,移入 4~10 个胚胎及 26~40 个胚胎的 7 只和 12 只犬无怀孕现象;移入 11~25 个胚胎的 17 只犬怀孕率为 23.53%,最终 5 只犬诞生。结果显示对于供体犬移入的重组胚胎数量影响其怀孕及产仔率。Jang 等^[35]研究显示将小品种犬(贵宾犬)的体细胞移入大品种犬的去核卵母细胞中也可以获得克隆犬。说明犬的克隆可在犬的不同品种间实现。Hong 等^[36]采用逆转录病毒转染法及胎儿成纤维细胞体细胞核移植,首次获得了表达红色荧光蛋白的转基因犬。

目前所获得的克隆犬采用的都是体内成熟犬卵母细胞及自然同期发情的供受体,所以犬的克隆技术还很不完善,有赖于提高犬的卵母细胞体外培养成熟率及诱导同期发情技术。

6 结语

犬繁殖调控技术的发展比较缓慢,主要是由于目前对犬的特殊生殖生理的研究比较匮乏。近几年来对犬繁殖调控技术的研究逐渐增多,并成功获得克隆犬和转基因犬。但目前犬体外胚胎生产以及克隆等技术由于受到卵母细胞体外成熟培养率低的影响而受到限制。随着现代生物技术的不断

发展完善,对犬及犬科动物特有的生殖生理现象的研究将会更加深入,从而将会更好的促进犬繁殖调控技术的研究。

参考文献:

- [1] Johnston S D, Kamolpatana K, Root-Kustritz M V, et al. Prostatic disorders in the dog [J]. Anim Reprod Sci, 2000, 60: 405-415.
- [2] 刘海军. 犬的发情诱导 [J]. 畜牧兽医杂志, 1994, 54-57.
- [3] 王新蕾. 自然发情母犬的雌孕激素变化规律初探 [J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18: 28-31.
- [4] Kutzler MA. Induction and synchronization of estrus in dogs [J]. Theriogenology, 2005, 64: 766-775.
- [5] Ithaca NY. Biology of gonadotrophin secretion in adult and female dog [J]. Int Veter Inform Service, 2001, 9: 102-104.
- [6] Concannon PW, Temple M, Montanez A, et al. Effects of dose and duration of continuous GnRH-agonist treatment on induction of estrus in beagle dogs: competing and concurrent up-regulation and down-regulation of LH release [J]. Theriogenology, 2006, 66: 1488-96.
- [7] 余道伦, 邢华, 朱德建. 犬辅助生殖技术研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2006, 34: 1591-1592, 1594.
- [8] 王禄华, 朱丽丽, 庞海涛, 等. PMSG 诱导犬发情的初步试验 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2008, 98-99.
- [9] 黄家良. 母犬诱导发情试验 [J]. 黑龙江动物繁殖, 2001, 9: 29-30.
- [10] 张玉西, 卓炳德. PMSG 对母犬诱发发情的作用及效果观察 [J]. 中国兽医杂志, 2007, 43: 62-63.
- [11] 谭建华, 安铁沫. PGF₂、eCG 及 hCG3 种生殖激素联用对母犬发情、卵泡发育及胚胎着床的影响 [J]. 中国兽医学报, 2002, 22: 394-396.
- [12] 孙兆增, 曾林, 洪宝庆, 等. 乙烯雌酚对间情期比格犬发情的诱导 [J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18: 36-38, 43.
- [13] 李小慧, 杨利国. 乏情母犬用溴隐亭处理后的发情表现与血清中孕酮和雌二醇水平变化 [J]. 畜牧与兽医, 2004, 36: 1-3.
- [14] Rota A, Jguer-Ouada M, Versteegen J, et al. Fertility after vaginal or uterine deposition of dog semen frozen in a tris extender with or without Equex STM paste [J]. Theriogenology, 1999, 51: 1045-1058.
- [15] Abe Y, Lee DS, Sano H, et al. Artificial insemination with canine spermatozoa frozen in a skim milk/glucose-based extender [J]. J Reprod Dev, 2008, 54: 290-294.
- [16] Bencharif D, Amirat L, Anton M, et al. The advantages of LDL (low density lipoproteins) in the cryopreservation of canine semen [J]. Theriogenology, 2008, 70: 1478-1488.
- [17] Thomassen R, Sanson G, Krogenaes A, et al. Artificial insemination with frozen semen in dogs: a retrospective study of 10 years using a non-surgical approach [J]. Theriogenology, 2006, 66: 1645-1650.
- [18] Pretzer SD, Lillich RK, Althouse GC. Single, transcervical

- insemination using frozen-thawed semen in the Greyhound: a case series study [J]. *Theriogenology* 2006 65:1029 - 1036.
- [19] Kim HJ, Oh HJ, Jang G, et al. Birth of puppies after intrauterine and intratubal insemination with frozen-thawed canine semen [J]. *J Vet Sci* 2007 8:75 - 80.
- [20] Hase M, Hori T, Kawakami E, et al. Plasma LH and progesterone levels before and after ovulation and observation of ovarian follicles by ultrasonographic diagnosis system in dogs [J]. *J Vet Med Sci* 2000 62:243 - 248.
- [21] Shimatsu Y, Yuzawa H, Aruga K, et al. Effect of time for mating and gestation length on reproductive efficiency in dogs [J]. *Reprod Domest Anim* 2007 42:664 - 665.
- [22] Tsutsui T, Takahashi F, Hori T, et al. Prolonged duration of fertility of dog ova [J]. *Reprod Domest Anim* 2009 44 Suppl 2: 230 - 233.
- [23] Fayrer-Hosken R. Embryo transfer in the dog and cat [J]. *Theriogenology* 2007 68:382 - 385.
- [24] Tsutsui T, Hori T, Okazaki H, et al. Transfer of canine embryos at various developmental stages recovered by hysterectomy or surgical uterine flushing [J]. *J Vet Med Sci* 2001 63:401 - 405.
- [25] Tsutsui T, Hori T, Kawakami E. Intratubal transplantation of early canine embryos [J]. *J Reprod Fertil Suppl* 2001 57:309 - 314.
- [26] Tsutsui T, Hori T, Endo S, et al. Intrauterine transfer of early canine embryos [J]. *Theriogenology* 2006 66:1703 - 1705.
- [27] Jang G, Kim MK, Oh HJ, et al. Birth of viable female dogs produced by somatic cell nuclear transfer [J]. *Theriogenology*, 2007 67:941 - 947.
- [28] 董君艳, 谢伟东, 姜红军. 犬胚胎移植手术路径研究性试验 [J]. *中国工作犬业* 2005 17 - 18.
- [29] 余道伦, 邢华, 李厚达. 犬输卵管胚胎移植实验研究 [J]. *中国畜牧杂志* 2007 43:12 - 14.
- [30] 孙秀青, 陈银霞. 犬的胚胎移植初步试验 [J]. *江苏农业科学* 2009 187 - 188.
- [31] Abe Y, Suwa Y, Yanagimoto-Ueta Y, et al. Preimplantation development of embryos in Labrador retrievers [J]. *J Reprod Dev* 2008 54:135 - 137.
- [32] Lee BC, Kim MK, Jang G, et al. Dogs cloned from adult somatic cells [J]. *Nature* 2005 436:641.
- [33] Hong SG, Jang G, Kim MK, et al. Dogs cloned from fetal fibroblasts by nuclear transfer [J]. *Anim Reprod Sci* 2009 115: 334 - 339.
- [34] Hossein MS, Jeong YW, Park SW, et al. Birth of Beagle dogs by somatic cell nuclear transfer [J]. *Anim Reprod Sci* 2009 114: 404 - 414.
- [35] Jang G, Hong SG, Oh HJ, et al. A cloned toy poodle produced from somatic cells derived from an aged female dog [J]. *Theriogenology* 2008 69:556 - 563.
- [36] Hong SG, Kim MK, Jang G, et al. Generation of red fluorescent protein transgenic dogs [J]. *Genesis* 2009 47:314 - 322.

修回日期)2010-09-30