

# 猪卵母细胞的体外受精及多精受精\*

李永海 焦丽红 侯毅 王维华\*\*

(中国科学院动物研究所计划生育生殖生物学国家重点实验室 北京 100080)

**摘要:** 对用于猪体外受精(IVF)的研究方法和技术,如传统的液滴 IVF、透明带下注射精子受精(SUZI)、卵母细胞质内单精注射受精(ICSI)及细管 IVF 等进行了简述。与其它动物相比,进行猪卵的体外受精研究,多精受精现象特别明显。大量的研究表明,猪卵的多精受精不但与其品种特性有关,而且与卵母细胞成熟的程度、透明带的异常、受精时获能精子的浓度、输卵管分泌物、受精液蛋白添加成分、NaHCO<sub>3</sub> 浓度、咖啡因、pH 值以及温度等因素密切相关。

**关键词:** 猪;卵母细胞;体外受精;多精受精

**中图分类号:** Q492 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2003)03-95-05

## *In Vitro Fertilization of Porcine Oocytes and Polyspermy*

LI Yong-Hai JIAO Li-Hong HOU Yi WANG Wei-Hua

(*Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China*)

**Abstract:** The methods and techniques used for porcine oocyte *in vitro* fertilization (IVF) are discussed. There are several methods of IVF used for porcine or other mammalian oocyte fertilization, such as conventional IVF in drops, sub-zonal injection (SUZI), intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and straw IVF. There is a greater incidence of polyspermy in porcine oocytes compared to that in other mammalian oocytes. It was verified that a lot of factors affect the incidence of porcine oocyte polyspermy, including immature or aged oocytes, zona abnormality, the number of capacitated sperm at the site of fertilization, oviduct secretions, protein supplementation, pH, concentration of NaHCO<sub>3</sub> in the fertilization medium and the temperature of the oocyte-sperm co-culture and its species-specificity.

**Key words:** Porcine oocyte; *In vitro* fertilization; Polyspermy

在生殖生物学研究领域,猪和其它动物一样,进行体外受精(IVF)的方法有多种,如传统的液滴 IVF、透明带下注射受精(SUZI)、卵母细胞质内单精注射受精(ICSI)及细管 IVF 等。在正常生理条件下,哺乳动物的受精过程发生在输卵管内,不利于进行受精机理的研究。自 20 世纪 50 年代张明觉和 Austin 等人在体外使兔卵受精获得成功之后,人们对各种动物卵母细胞体外成熟(IVM)、IVF 和体外胚胎培养(IVC)的方法及技术进行了广泛深入的研究,借助于生物化学、分子生物学及

显微受精技术,人们正在逐渐弄清精子激活、精卵融合、卵子激活以及原核形成的详细机制。与其它动物

---

\* 中国科学院“百人计划”,国家杰出青年基金项目资助(No. 30125007);

\*\* 通讯作者;

**第一作者介绍** 李永海,男,38岁,博士研究生,副教授;研究方向:生殖生物学;E-mail: liyh@panda.ioz.ac.cn。

收稿日期:2002-09-20,修回日期:2003-01-20

相比,猪的卵母细胞对外界环境条件的变化更为敏感,其IVM、IVF、IVC的各项检测指标均较低,其中最大的问题则是多精受精。所谓多精受精是指受精时有两个或两个以上的精子穿入卵母细胞。研究者普遍认为多精受精可导致受精卵发育停止或形成非整倍体,而后者是导致早期胚胎死亡、流产、胎儿遗传性疾病的主要原因。大多数动物的卵母细胞在其生长发育过程中可获得阻止多精受精的能力<sup>[1]</sup>。受精时阻止多精的穿入主要是由卵母细胞的质膜和透明带完成的。海胆和无尾两栖类动物卵母细胞的去极化很快可阻止多精受精,哺乳动物卵质膜阻止多精受精的机理尚不清楚。小鼠、仓鼠<sup>[2]</sup>和人卵的质膜确有阻止多精受精的作用,但猪卵的质膜却似乎无此作用<sup>[3]</sup>。皮质反应和透明带反应是受精时阻止多精受精的两个重要生理功能。因此除了品种差异以外,影响皮质反应和透明带反应的体内外因素必然会影响正常受精。在所有的哺乳动物当中,进行IVF时猪的多精受精现象最为突出。本文根据现有资料对猪的体外受精方法以及影响猪体外受精时多精受精的可能因素进行了综述。

## 1 体外受精方法

**1.1 传统的液滴IVF** 无论是体内还是体外成熟的(M II期)猪卵母细胞均可用于体外受精;而精子可以是鲜精也可以是冷冻后的解冻精子,但必须经过获能处理。一般哺乳动物的精子可以在Tyrode's和Krebs-Ringer's液或类似的人工培养基中存活并获能,但也有一些动物的精子需在获能液中添加某些成分才能获能。肝素可使牛精子更易获能,肝素可能是辅助祛除结合在精子表面的精浆组分而发挥作用。咖啡因和BSA是灵长类和猪获能所必需的物质。猪的IVF液常见的有三种,即BO液(Brackett-Oliphant Medium)、TCM-199液和TBM液(Tris-buffer Medium),用前均需添加一定浓度的咖啡因和牛血清白蛋白(BSA)<sup>[4,5]</sup>。受精时,将30~35个成熟的卵母细胞和用DPBS或TCM-199液洗涤过的浓度为 $1 \times 10^6$ 个精子/ml精液移入油盖的50  $\mu$ l IVF液滴中,在39℃、100%湿度、5%二氧化碳培养箱中孵育6 h左右即可完成受精,14~16 h形成原核<sup>[5,6]</sup>。

**1.2 SUZI及ICSI** SUZI和ICSI在目前已广泛用于治疗由男性引发的受精障碍的两种显微受精方法。用于猪的IVF主要可以解决多精受精问题。SUZI是将一个或多个活精子注入PVS,注射部位一般选在第一极体区域,注射时要注意控制精子的数目,防止精子溢出。ICSI是将精子直接注入卵母细胞的胞质内以完成受精<sup>[7]</sup>。对人ICSI和SUZI的研究表明,ICSI对卵母细胞

的机械损伤大于SUZI,但是ICSI法的受精率(49.1%)显著高于SUZI法(16.6%),而随后两原核形成率无明显差异(分别为74%和80%),不过ICSI比SUZI法产生更多的非整倍体胚胎<sup>[8]</sup>。将猪未获能的精子分别进行SUZI和ICSI实验,其受精率、卵裂率和体外2~8细胞发育率均无明显差异。具体方法是将精子事先用DPBS或TCM-199液洗涤3次,卵子要经10 000 r/min离心5 min,以使脂滴集中于一侧局部,便于观察针头的刺入部位。操作液用Hepes-TL-PVA或NCSU-23(North California State University-23 Medium)5~10  $\mu$ l即可,放置精子的液滴操作时添加等量的10%PVP,以制动精子并润滑注射针<sup>[9]</sup>。ICSI也可注射死精子或不能运动的其它生精细胞,经过电融合后使其融入卵母细胞并继续发育。精子获能和顶体反应与否,对于ICSI并不重要,但在SUZI时应采用获能精子<sup>[7]</sup>。

**1.3 细管IVF** 这是作者实验室新近摸索的一种IVF方法,目的是用来减少多精受精,提高正常受精率和囊胚发育率。该法将精子和卵子放入细管(0.25 ml-Straw)的两端,中间为获能液,精子边向卵子的方向游动边获能,最先接触卵子的精子引起透明带反应和皮质反应并激活卵子,有效地阻止了后来的精子入卵。与传统液滴IVF相比,细管IVF能够大幅度减少到达受精部位精子的数量,有效地降低多精受精率(由60%减少到30%)。

## 2 影响多精受精的因素

除了品种差异和受精方法对多精受精的影响以外,受精时某些环境条件的变化也是影响多精受精发生率的重要因素。

**2.1 卵母细胞的成熟程度** 大量的研究表明,与成熟的卵母细胞相比,未成熟卵由于不能发生完善的皮质反应和透明带反应而呈现较高的多精受精率<sup>[10,11]</sup>。用未成熟卵子受精时,精子的穿入并不能使卵子释放皮质颗粒(CGs)<sup>[12,13]</sup>。未成熟卵子的多精受精可能与以下几个方面有关:(1)精子穿入未成熟卵子时引起的钙颤不明显,即使直接向卵内注射钙或1,4,5-三磷酸肌醇(IP<sub>3</sub>)也难以奏效<sup>[14,15]</sup>;(2)CGs在质膜下的分布不均匀;(3)未成熟卵中内质网的数目较少<sup>[15]</sup>,内质网是储存钙的细胞器之一;(4)未成熟卵上IP<sub>3</sub>受体的数目较少,致使卵子对相应激活因子的刺激不敏感<sup>[16]</sup>。

由于成熟卵能够维持阻止多精受精能力的时间很短,很容易发生老化。卵子老化后,只能部分释放或不能释放CGs,致使皮质反应不彻底或不能发生皮质反应,因而导致多精受精<sup>[10]</sup>。

**2.2 透明带异常** 透明带主要由 ZP<sub>1</sub>、ZP<sub>2</sub>、ZP<sub>3</sub> 等糖蛋白构成。尽管尚未彻底弄清透明带阻止多精受精的机理,但人们普遍认为是卵子激活时释放到卵周隙(PVS)的 CGs 内容物使透明带发生了某些改变,从而阻止了以后精子的穿入<sup>[17]</sup>。在微分干涉相差显微镜下观察,透明带呈现均匀的半透明状,但用偏光显微镜观察正常人卵时,则可明显地看到它的三层结构。多精受精且形成多原核的受精卵,其透明带内层有微细的间断<sup>[18]</sup>。用偏光显微镜观察受精后的人卵透明带是预测多精受精的一种简便可行且对受精卵无任何伤害的方法。Familiari 等发现不育病人透明带异常的卵母细胞较多,他们据此推测透明带的内层对阻止多精受精极为重要<sup>[19]</sup>。

**2.3 卵泡细胞的作用** 卵丘细胞和颗粒细胞上的特有成分能够促进精子获能和发生顶体反应。将卵丘细胞和颗粒细胞在体外培养 36 或 48 h,再将其冻融后加入到 IVF 液中,可显著地提高精子入卵率,而降低多精受精率<sup>[11]</sup>。在进行 IVF 操作时,如果在卵母细胞上保留一定数量的卵丘细胞和放射冠细胞,则可明显提高雄原核(MPN)的形成率<sup>[20]</sup>。如果在 IVM 时将卵母细胞与卵泡细胞共培养,则可提高卵母细胞内谷胱甘肽的含量和受精后囊胚发育率<sup>[21]</sup>。

**2.4 精子的浓度** 无论是体内还是体外的研究均表明,受精时到达受精部位的精子数目与多精受精的发生率密切相关。正常情况下猪体内受精时多精受精率不到 5%,但在有人为因素干预时其多精受精率可多达 60%。这些因素包括在黄体期注射促性腺激素促进排卵、授精延迟、局部注射孕酮及输卵管授精等。在所有这些情况下都发现有过多的精子聚集于受精部位。授精延迟和局部注射孕酮也可使兔子发生多精受精。在生理条件下输卵管壶腹能够调节到达受精部位的精子数量,但即使第一个精子入卵时引起 CGs 的正常释放,如果到达受精部位精子的数量较多,多精受精率也会提高。当受精卵通过有较多获能精子的输卵管壶腹部或其它部位时,精子只能结合到受精卵的外层,而不能进入内层或 PVS<sup>[22]</sup>。体外的研究也证明,无论是体内成熟还是体外成熟的精子,多精受精率随着精子浓度的升高而提高<sup>[23]</sup>。IVF 时也可发生 CGs 的释放<sup>[12,13]</sup>,但发生透明带反应的时间推迟<sup>[6]</sup>。

**2.5 输卵管分泌物** 与体内自然受精相比,体外受精时多精受精的发生率较高。Cran 和 Cheng 研究发现,体外受精卵 CGs 释放的时间往往延迟且不完全释放,体内受精卵则多将 CGs 内容物完全释放到 PVS 中。但是,如果 IVF 时释放的 CGs 内容物仍然滞留在质膜的外

面,也就是 CGs 中的酶类没有立即作用于透明带,这样就会发生透明带反应延迟<sup>[24]</sup>。CGs 内容物向 PVS 的扩散取决于 IVF 液中钙的浓度。在进行 IVF 时,体外成熟的卵比体内成熟的卵更容易发生多精受精<sup>[25]</sup>。人们已从许多哺乳动物体内成熟卵母细胞的透明带上、PVS 和质膜上发现了输卵管分泌的蛋白质<sup>[26,27]</sup>。将体外成熟的卵母细胞在含有输卵管液或输卵管上皮细胞的培养液中培养一段时间后,也可降低其多精受精现象<sup>[28]</sup>。这些资料说明输卵管上皮细胞分泌的某些糖蛋白可以进入 PVS,促进卵子发生皮质反应和透明带反应。

人们还通过体内外的研究观察了输卵管上皮细胞对精子功能的影响。在体内,精子借助于输卵管上皮细胞纤毛的摆动从子宫运动到输卵管伞部,并且只有获能的精子才能游出壶腹部的精子储存部位而到达受精部位。与上皮细胞质膜的接触,可加强精子的运动能力,抑制自发性顶体反应。所以,即使只有数百个精子到达受精部位,就足以使所有的卵子受精<sup>[22]</sup>。体外的研究表明,将精子与输卵管上皮细胞共培养,可控制精子的运动,因而阻止多精受精<sup>[29]</sup>。精子与上皮细胞结合,抑制发生自发性顶体反应,从而保留了精子的受精能力<sup>[30]</sup>。

**2.6 蛋白质添加物** 近期的研究结果证明,某些动物的精子和卵子在限定化学成分的 IVF 液中也能受精,蛋白质是其中极其重要的成分。BSA 和胎牛血清(FCS)被广泛地用于动物的 IVF,而人血清白蛋白和母源血清被用于人的 IVF<sup>[31]</sup>。在牛和猪的 IVF 液中添加 FCS 能够增加多精受精率,而添加 BSA 则不增加甚至能减少多精受精率<sup>[33]</sup>。人们发现 FCS 能够降低 IVF 液中有效钙的浓度,从而抑制 CGs 内容物的扩散,推迟或阻止了它对透明带的作用。除此之外,FCS 还能够抑制透明带反应<sup>[35,36]</sup>。所以,FCS 可能不是用于动物 IVF 的合适蛋白。

**2.7 NaHCO<sub>3</sub> 及 Tris 盐** NaHCO<sub>3</sub> 也是 IVF 液中的一种重要成分,它能够维持精子的运动,促进精子获能,诱导顶体反应<sup>[33,34]</sup>。近几年来,TBM 被用于猪的 IVF,且能减少多精受精<sup>[38]</sup>。Tris 盐是如何调节精、卵功能的,目前尚不清楚。

**2.8 pH 值和温度** pH 值也是调节精子获能和顶体反应的一个重要因素,IVF 液的 pH 值越高,受精率也越高<sup>[33,34]</sup>,但过高的 pH 值会降低 CGs 释放的酶的活性<sup>[32]</sup>。牛精子的最佳穿卵温度为 39℃,如果降低 2℃ 则受精率下降 15% 以上。Cheng 等在猪的 IVF 研究中发现,影响猪精子穿卵成功率的主要因素是孵育温度,37℃ 时受精率不到 1%,而在 39℃ 时可达 89%<sup>[39]</sup>。

2.9 肝素和咖啡因 Chikamatsu 等对比了牛精子经不同的获能处理对受精的影响,结果表明咖啡因处理精子导致 33% 的多精受精,而用肝素处理的多精受精率则不到 8%<sup>[40]</sup>。而王维华等则发现对于猪的 IVF,咖啡因是必需的<sup>[37]</sup>。

综上所述,猪 IVF 的基本方法已经建立起来,但是,与体内受精的结果相比,IVF 的结果尚有很大潜力可以挖掘,尤其是在减少多精受精方面,很有希望在方法学上发现新的突破口。完全成熟且透明带正常的卵母细胞在恰当的条件下与一定浓度的精子相互作用才能完成正常受精。无论在体内还是在体外,卵母细胞生长发育不完全,或胞质成熟不完全,或受到不适当的激素刺激后造成卵母细胞本身或其透明带异常,均可导致多精受精。IVF 时精子浓度过高,IVF 液的组成成分不当,或其它环境条件不合适,也是造成多精受精的重要因素。虽然由于种属间的差异使得某些研究结果不具备可比性,但对大多数动物而言,从分子水平上探讨减少多精受精的机制是完全可行的,且应该具有普遍性的意义,应在这方面多开展一些研究。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Ducibella T, Kurasawa S, Rangarajan S, *et al.* Precocious loss of cortical granules during mouse oocyte meiotic maturation and correlation with an egg induced modification of the zona pellucida. *Dev Biol*, 1990, **137**: 46 ~ 55.
- [ 2 ] Stewart-Savage J, Bavister B D. A cell surface block to polyspermy occurs in golden hamster eggs. *Dev Biol*, 1988, **128**: 150 ~ 157.
- [ 3 ] Wang W H, Machanty Z, Abeydeera L R, *et al.* Parthenogenetic activation of pig oocytes with calcium ionophore and the block to sperm penetration after activation. *Biol Reprod*, 1998, **58**: 1 357 ~ 1 366.
- [ 4 ] Wang W H, Day B N. Development of porcine embryos produced by IVM/IVF in a medium with or without protein supplementation: effects of extracellular glutathione. *Zygote*, 2002, **10**(2): 109 ~ 115.
- [ 5 ] Li Y H, Liu R H, Jiao L H, *et al.* Synergetic effects of epidermal growth factor and estradiol on cytoplasmic maturation of porcine oocytes. *Zygote*, 2002, **10**(4): 349 ~ 354.
- [ 6 ] Wang W H, Abeydeera L R, Cantley T C, *et al.* Effects of oocyte maturation media on development of pig embryos produced by *in vitro* fertilization. *J Reprod Fertil*, 1997, **111**: 101 ~ 108.
- [ 7 ] 陈大元主编. 受精生物学. 北京: 科学出版社, 2000. 387 ~ 389.
- [ 8 ] Steirteghem A V, Liu J E, Joris H. Assisted fertilization by subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection. *Reprod Fert Dev*, 1994, **6**: 85 ~ 91.
- [ 9 ] Martin M J. Development of *in vivo*-matured porcine oocytes following intracytoplasmic sperm injection. *Biol Reprod*, 2000, **63**: 109 ~ 112.
- [ 10 ] Niwa K, Park C-K, Okuda K. Penetration *in vitro* of bovine oocytes during maturation by frozen-thawed spermatozoa. *J Reprod Fertil*, 1991, **91**: 329 ~ 336.
- [ 11 ] Wang W H, Uchida M, Niwa K. Effects of follicle cells on *in vitro* penetration of pig oocytes by cryopreserved, ejaculated spermatozoa. *J Reprod Dev*, 1992, **38**: 125 ~ 131.
- [ 12 ] Wang W H, Hosoe M, Shioya Y. Induction of cortical granule exocytosis of pig oocytes by spermatozoa during meiotic maturation. *J Reprod Fertil*, 1997, **109**: 247 ~ 255.
- [ 13 ] Wang W H, Sun Q Y, Hosoe M, *et al.* Quantified analysis of cortical granule distribution and exocytosis of porcine oocytes during meiotic maturation and activation. *Biol Reprod*, 1997, **56**: 1 376 ~ 1 382.
- [ 14 ] Machaty Z, Funabashi H, Day B N, *et al.* Developmental changes in the intracellular Ca<sup>2+</sup> release mechanisms in porcine oocytes. *Biol Reprod*, 1997, **56**: 921 ~ 930.
- [ 15 ] Mehlmann L M, Kline D. Regulation of intracellular calcium in the mouse egg: calcium release in response to sperm or inositol trisphosphate is enhanced after meiotic maturation. *Biol Reprod*, 1994, **51**: 1 088 ~ 1 098.
- [ 16 ] Mehlmann L M, Mikoshiba K, Kline D. Redistribution and increase in cortical inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptors after meiotic maturation of the mouse oocyte. *Dev Biol*, 1996, **180** (2): 489 ~ 498.
- [ 17 ] Bauskin A R, Franken D R, Eberspaecher U, *et al.* Characterization of human zona pellucida glycoproteins. *Mol Hum Reprod*, 1999, **5**: 534 ~ 540.
- [ 18 ] Keefe D, Tran P, Pellegrini C, *et al.* Polarized light microscopy and digital image processing identify a multi-laminar structure of the hamster zona pellucida. *Hum Reprod*, 1997, **12**: 1 250 ~ 1 252.
- [ 19 ] Familiari G, Nottola S A, Macchiarelli G, *et al.* Human zona pellucida during *in vitro* fertilization: an ultra structural study using saponin, ruthenium red, and osmium-thiocarbohydrazide. *Mol Reprod Dev*, 1992, **32**: 51 ~ 61.
- [ 20 ] Ka H H, Sawai K, Wang W H, *et al.* Amino acids in maturation medium and presence of cumulus cells at fertilization promote male pronuclear formation in porcine oocytes matured and penetrated *in vitro*. *Biol Reprod*, 1997, **57**: 1 478 ~ 1 483.
- [ 21 ] Abeydeera L R, Wang W H, Cantley T C, *et al.* Coculture with follicular shell pieces can enhance the developmental competence of pig oocytes after *in vitro* fertilization: relevance to

- intracellular glutathione. *Biol Reprod*, 1998, **58**: 213 ~ 218.
- [22] Hunter R H F. Oviduct function in pigs, with particular reference to the pathological condition of polyspermy. *Mol Reprod Dev*, 1991, **29**: 385 ~ 391.
- [23] Nagai T, Niwa K, Iritani A. Effect of sperm concentration during preincubation in a defined medium on fertilization *in vitro* of pig follicular oocytes. *J Reprod Fertil*, 1984, **70**: 271 ~ 275.
- [24] Cran D G, Cheng W T K. The cortical reaction in pig oocytes during *in vivo* and *in vitro* fertilization. *Gamete Res*, 1986, **13**: 241 ~ 251.
- [25] Wang W H, Abeydeera L R, Prather R S. *et al.* Morphologic comparison of ovulated and *in vitro*-matured porcine oocytes, with particular reference to polyspermy after *in vitro* fertilization. *Mol Reprod Dev*, 1998, **49**: 308 ~ 316.
- [26] Brown C R, Cheng W K T. Changes in composition of the porcine zona pellucida during development of the oocyte to the 2-to 4-cell embryo. *J Embryol Exp Morph*, 1986, **92**: 183 ~ 191.
- [27] Bui W C, O'Brien B, Alvarez I M, *et al.* Immunogold localization of porcine oviduct secretory proteins within the zona pellucida, perivitelline space, and plasma membrane of oviduct and uterine oocytes and early embryos. *Biol Reprod*, 1993, **48**: 1 274 ~ 1 283.
- [28] Kim N H, Funahashi H, Abeydeera L R, *et al.* Effects of oviductal fluid on sperm penetration and cortical granule exocytosis during fertilization of pig oocytes *in vitro*. *J Reprod Fertil*, 1996, **107**: 79 ~ 86.
- [29] Nagai T, Moor R M. Effect of oviduct cells on the incidence of polyspermy in pig oocytes fertilized *in vitro*. *Mol Reprod Dev*, 1990, **26**: 377 ~ 382.
- [30] Dubuc A, Sirard M A. Effect of coculturing spermatozoa with oviduct cells on the incidence of polyspermy in pig *in vitro* fertilization. *Mol Reprod Dev*, 1995, **41**: 360 ~ 367.
- [31] Kouba A J, Abeydeera L R, Alvarez I M, *et al.* Effects of the porcine oviduct-specific glycoprotein on fertilization, polyspermy, and embryonic development *in vitro*. *Biol Reprod*, 2000, **63**: 242 ~ 250.
- [32] Miller D J, Gong X, Decker G, *et al.* Egg cortical granule N-acetylglucosaminidase is required for the mouse zona block to polyspermy. *J Cell Biol*, 1993, **123**: 1 431 ~ 1 441.
- [33] Tajik P, Niwa K, Murase T. Effects of different protein supplements in fertilization medium on *in vitro* penetration of cumulus-intact and cumulus-free bovine oocytes matured in culture. *Theriogenology*, 1993, **40**: 949 ~ 958.
- [34] Wang W H, Abeydeera L R, Fraser L R, *et al.* Functional analysis using chlortetracycline fluorescence and *in vitro* fertilization of frozen-thawed ejaculated spermatozoa incubated in a protein-free chemically defined medium. *J Reprod Fertil*, 1995, **104**: 305 ~ 313.
- [35] Zhang X, Rutledge J, Khamsi F, *et al.* Release of tissue-type plasminogen activator by activated rat eggs and its possible role in the zona reaction. *Mol Reprod Dev*, 1992, **32**: 28 ~ 32.
- [36] Niwa K, Wang W H. Cortical granules and cortical reaction in pig oocytes. In: Miyamoto H, Manabe H ed. *Reproductive Biotechnology: Reproductive Biotechnology Update and Its Related Physiology*. Hokudo Printing Co. Kyoto, Japan, 2001. 27 ~ 34.
- [37] Wang W H, Niwa K, Okuda K. *In-vitro* penetration of pig oocytes matured in culture by cryopreserved ejaculated spermatozoa. *J Reprod Fertil*, 1991, **93**: 491 ~ 499.
- [38] Abeydeera L R, Day B N. *In vitro* penetration of pig oocytes in a modified Tris-buffered medium: effect of BSA, caffeine and calcium. *Theriogenology*, 1997, **48**: 537 ~ 544.
- [39] Cheng W T K, Moor R M, Polge C. *In vitro* fertilization of pig and sheep oocytes matured *in vivo* and *in vitro*. *Theriogenology*, 1986, **25**: 146 ~ 152.
- [40] Chikamatsu N, Urakawa M, Fukui Y, *et al.* *In vitro* fertilization and early development of bovine oocytes matured in different culture systems and inseminated with spermatozoa treated by different methods. *J Anim Reprod*, 1989, **35**: 154 ~ 158.