

哺乳动物卵母细胞生发泡移植

崔龙波* 孙方臻¹

(烟台大学生物化学系, 烟台 264005; ¹中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100080)

摘要 生发泡(GV)移植是指将GV期卵母细胞的GV移入到去核的受体细胞(GV期卵母细胞、MII期卵母细胞或受精卵)透明带下,经融合形成一个重组卵的过程。GV移植对研究卵母细胞的细胞周期调控、成熟及受精时细胞核与细胞质之间的相互作用非常重要,可用于研究卵母细胞减数分裂异常和与年龄相关变化之间的关系及细胞质衰老与卵母细胞非整倍性之间的关系。现简要介绍了GV移植的基本程序,GV核体与胞质体的融合,重组卵的培养条件,重组卵成熟后的受精、人工激活和胚胎发育能力以及GV移植的意义。

关键词 生发泡;核移植;减数分裂

生发泡(germinal vesicle, GV)移植是最近几年才建立起来的一种技术,它对研究减数分裂期间细胞核和细胞质之间的相互作用具有非常重要的意义。GV移植主要是指将GV期卵母细胞的GV移植到去核的GV期卵母细胞透明带下,经融合形成一个重组GV期卵母细胞的过程,另外也包括将GV期卵母细胞的GV移植到其他受体细胞质(如去核的MII期卵母细胞和受精卵)形成重组卵的过程。迄今为止,已在小鼠^[1~4]、人^[5,6]、兔^[7,8]、牛^[9]等动物进行了GV移植研究,并获得了直接由GV移植的重组卵母细胞发育到期的兔^[7]。

1 GV移植的基本操作程序

首先将收集到的GV期卵母细胞在含有IBMX或dbcAMP(抑制GVBD的试剂)的培养液中培养2h左右,以形成卵周隙。用切口针对透明带进行切口,用移核针去除供体卵母细胞带少量胞质的GV核体,然后将供体的GV核体移入到已去GV的受体GV期卵母细胞透明带下,通过融合形成一个重组GV期卵母细胞。然后在体外进行成熟培养,观察重组卵减数分裂成熟情况。成熟的重组卵还可再经人工激活或受精进一步观察其活化率或受精率及胚胎发育能力。结果表明,GV移植时的每一步成功率,包括细胞存活、去核、移核和重组,在小鼠超过90%,重组的总有效率为80%^[2];在人超过80%,总有效率为73%^[6]。同时,GV移植时GV和受体胞质的完整性未被显微操作和融合处理所损害,这是因为重组卵母细胞的成熟率与对照卵母细胞的相

同,并有正常的核型和减数分裂纺锤体,证明GV移植后的重组GV期卵母细胞能正常成熟^[2~4,6]。

2 GV核体与受体胞质体的融合

由未成熟卵母细胞制备的胞质体较由成熟卵母细胞制备的胞质体弹性低,在胞质体与核体之间不易建立接触,因而融合率较低。在GV移植时,仅见使用仙台病毒融合和电融合。仙台病毒融合仅见于一个实验室使用^[1,10,11],GV核体与受体胞质体的融合率可达90%~99%。但多数实验室都是应用方便而安全的电融合方法。影响电融合的因素很多,在GV核体与胞质体的融合过程中,主要考虑了3个因素:融合液、电场条件和细胞在电场中的定位方式。见于报道的融合液有两类,一类是电解质液如M2液和HEPES缓冲的HTF液,另一类是非电解质液,主要是含0.1 mmol/L CaCl₂、0.05 mmol/L MgSO₄的0.3 mol/L甘露醇。Takeuchi等^[2]比较了在同一电场条件下电解质液(M2液)与3种非电解质液(0.3 mol/L甘露醇、0.25 mol/L蔗糖和Zimmermann氏细胞融合液)的融合效果,结果表明M2液的融合率(80.6%)明显高于3种非电解质液(分别为9.0%、2.2%和10.1%),且未观察到M2液作为融合液时对细胞存活和成熟的不利影响。应用HEPES缓冲的HTF液作为融合液其融合率也很高(81.6%)^[6]。但其

收稿日期:2004-04-13 接受日期:2004-06-18

国家重点基础研究发展规划项目(973计划)(No.G1999055902)资助

*通讯作者。Tel: 0535-6903037, Fax: 0535-6902063, E-mail:

lbcai@163.com

他作者以 0.3 mol/L 甘露醇作为融合液, 也取得了很高的融合率, 在人为 87.5%^[4], 在鼠为 89%~95%^[12], 但他们是 HEPES 缓冲的 HTF 液作为溶剂的。细胞融合过程是电脉冲电压强度及脉冲持续时间综合作用的结果, 一般二者呈反比关系。目前报道的 GV 移植研究中多采用的是相对较低场强(1.5 KV/cm 以下)与长脉冲(50~90 μ s)的组合。在 GV 移植时如用非电解质液为融合液, 多使用交流定位方式来排列细胞^[3,4,12]; 而以电解质液为融合液时, 若用交流定位方式, 当交流脉冲通过导电的电解质液时会导致局部加热随后造成细胞损伤。由于核移植实验仅处理少量的细胞, 因而可以手动排列细胞, 通过避免交流电的作用, 使电融合期间不可预知的有害作用降至最低^[2,6,13]。

3 重组卵母细胞的培养条件

由 GV 移植重组的 GV 期卵母细胞, 在 M199^[2,7,14]、HTF^[3-6,12]、Waymouth^[1,10,11]和 TCM199^[8,9]等培养液中进行体外培养, 都获得了较高的成熟率。M199 和 HTF 培养液常补充胎牛血清或牛(或人)血清白蛋白。Zhang 等^[5]在用 HTF 液培养人重组卵时, 还加入颗粒细胞共培养, 其成熟率为 64%, 与对照卵母细胞(57%)无差异。Li 等^[14]在 M199 培养液中补以 PMSG, Moffa 等^[4]在 HTF 培养液中补以胰岛素和 Pergonal(等体积的 FSH 和 LH), 但他们都发现是否补充这些激素对卵母细胞的成熟率均没有影响, 不过加入 PMSG 后能改善受精后的早期卵裂^[4]。Liu 等^[12]比较了几种培养液对重组卵的成熟和活化以及对体内受精的合子的作用, 清楚的表明 GV 移植的成功率可受到所选择的培养液的影响。在 HTF 和 S1 培养液的成熟率和活化率显著高于 M199 培养液, 这是一个令人奇怪的结果, 因为 M199 液广泛应用于卵母细胞的体外成熟。此外 M199 液不能支持体内受精的合子发育到囊胚期, 而连续在 S1-S2 液培养时, 发育到囊胚的比率最高。他们正在研究培养液添加剂对体外成熟的卵母细胞胞质功能完善的有关影响, 如 oestradiol, 一种能改善人 GV 期卵母细胞胞质成熟的甾类化合物^[12]。

4 重组卵母细胞成熟后的受精、人工激活及胚胎发育能力

4.1 重组卵母细胞受精后发育受阻的原因

GV 移植这项技术一经建立后, 人们并不单纯满足于重组卵的体外成熟, 对成熟后的重组卵的活化和胚胎发育能力又进行了研究。虽然通过 GV 移植的重组卵可以在体外正常成熟, 但人们预计这样的重组卵在受精后的发育能力会受到伤害, 因为进行 GV 移植时必须收集和使用 GV 期卵母细胞, 而后重组卵又只能在体外成熟, 因此 GV 期卵母细胞就被从尚未受到促性腺激素峰作用之前的成熟卵泡里的正常生理状态下取出来, 被剥夺了促性腺激素直接和间接的作用, 而这些作用在正常情况下能启动卵母细胞最后阶段的成熟。同时, 所收集和使用的 GV 期卵母细胞又必须去掉卵丘细胞以便 GV 移植时能见到细胞结构, 而研究表明卵母细胞-卵丘细胞的连接和相互作用对卵母细胞发育和功能的多个方面都是重要的^[15-17], 甚至将未成熟的卵母细胞与卵丘细胞共培养也不能克服成熟前卵丘细胞被去除的作用^[18]。GV 移植可以作为一项措施以挽救来自在第一次减数分裂期间因女性衰老相关的非整倍性增加的基因组^[4]。然而, 如果这种挽救是可行的话, 重组卵必须能受精, 随后进行胚胎发育。

4.2 重组卵母细胞的活化和胚胎发育能力

Bao 等^[11]将重组的小鼠 GV 期卵母细胞在体外成熟后, 直接在 T6 培养液中与精子作用 3 h 以上, 结果形成雌原核和雄原核的比率分别为 94% 和 78%。Takeuchi 等^[6]将重组的人 GV 期卵母细胞体外成熟后, 通过胞质内精子注射(ICSI)进行体外受精, 结果存活率为 77%, 受精率为 52%, 培养到第 3 天, 有 2 个原核的受精卵的卵裂率为 93.8%, 但仅有个别受精卵发育到 8-细胞和桑椹胚, 这与用体外成熟的对照卵母细胞获得的结果无何差异, 表明由 GV 移植重组的卵母细胞保持体外成熟和 ICSI 后正常受精的能力。

Liu 等^[12]将重组的小鼠 GV 期卵母细胞体外成熟后, 用 A23187 和茴香霉素(anisomycin)人工激活, 形成一个单倍体原核, 其活化率为 87%, 活化卵的核型有 75% 显示正常。然后再进行原核移植或互换, 形成两种重组合子: I 型合子, 由体内受精合子的雄原核移入到激活的重组卵中构成; II 型合子, 由激活的重组卵的雌原核移入到去雌原核的体内受精合子中构成。I 型和 II 型合子发育到 2-细胞的比率分别为 86% 和 99%, 发育到桑椹胚和囊胚的比率分别为 47% 和 73%, II 型合子的发育能力显著好于 I 型合子, 并且形成的胚胎的质量也好于后

者。结果表明, 小鼠GV期卵母细胞的细胞核在经历了GV和原核连续的核移植及在异体细胞质中的成熟和活化后, 能进行正常的染色体凝集和分裂, 然后胚胎发育到囊胚。将细胞核第2次移入到第3个细胞质环境(有机会在体内完全成熟), 实际上导致更为活跃的生长与发育。与细胞核相反, 小鼠GV期卵母细胞的细胞质在经历了GV和原核连续的核移植后, 其发育潜能似乎受到物理操作和化学作用的伤害, 导致产生低质量的胚胎, 这样的胚胎难以建立妊娠^[2]。Kono等^[1]将重组的小鼠GV期卵母细胞在体外成熟后再进行核移植, 形成两种重组MII期卵母细胞。一是将成熟的重组GV期卵母细胞的核移入到另一体内刚排出的MII期卵母细胞中, 这样的重组MII期卵母细胞用Sr²⁺人工活化, 活化率为64%, 经体外培养发育至囊胚的比率为84%(占活化卵数), 囊胚移植入假孕母体能发育到第10天。二是由将成熟的重组GV期卵母细胞的核移入到另一体内刚排出的去核MII期卵母细胞中形成, 这样的重组MII期卵母细胞进行体外受精, 受精率为51.6%, 经体外培养发育至囊胚的比率为70%(占受精卵数), 囊胚移植入假孕母体后有4个发育到期。Bao等^[10]采用同样的技术路线, 重组MII期卵母细胞的受精率为64%, 经体外培养发育到2-细胞和囊胚的比率分别为93%和86%(均指占受精卵数), 囊胚移植入假孕母体后有30%发育到期。

尽管在2个不同成熟的时期连续进行核移植后生出小鼠^[1,10], 但仍需进一步的研究来确定正常的后代能否由GV期卵母细胞的单次核移植所获得, 这一点在兔已做到。Li等^[7]将由GV移植获得的兔重组GV期卵母细胞体外成熟后, 通过胞质内精子注射(ICSI)进行体外受精, 结果存活率(68%~75%)、卵裂率(56%~65%)和发育至囊胚的比率(7%~9%)与对照(分别为85%、67%和19%)无差异, 将93个受精卵移入6只受体兔后, 生出2只后代, 这是第一个通过GV移植的重组卵获得的动物。结果表明经GV移植的重组卵母细胞可以正常受精和发育到期^[7]。

5 GV移植的意义

5.1 研究细胞核与细胞质相互作用的重要细胞模型

通过GV移植建立的重组GV期卵母细胞提供了一个有价值的细胞模型: 研究在减数分裂成熟、调

控及受精期间细胞核与细胞质之间的相互作用。为弄清在卵母细胞生长期, 卵母细胞的细胞核何时获得了受精后原核形成的能力, Bao等^[11]将1~20日龄小鼠卵母细胞的细胞核通过GV移植移入长足去核的GV期卵母细胞中, 成熟后的重组卵再经体外受精, 观察其原核形成情况。结果表明, 卵母细胞核成熟的能力不依赖于细胞质(因各组的成熟率无差异), 这种特性在细胞核到达第一次减数分裂的双线期即已出现; 用尚未生长或生长早期的卵母细胞重组的GV期卵母细胞不能使受精后的染色质去凝集, 原核形成所需的因子来源于长足的GV期卵母细胞中, 从精子染色质去凝集到雄原核再凝集的转变是由来自GV的因子控制的^[11]。虽然由发育不完善的1日龄小鼠卵母细胞的GV移入到长足去核的GV期卵母细胞所构成的重组卵能发育到MII期, 但体外受精时却不能形成原核, 为确定是否由于缺乏原核形成因子(被认为出现在GV中)所引起的, 将重组卵的MII期纺锤体再移入体内排出的去核或完整MII期卵母细胞中, 体外受精或活化时这样的卵母细胞能形成原核, 表明对这一事件所必需的因子聚集在卵母细胞生长期间的GV中^[11], 这些实验表明细胞质和细胞核成分的分化事件对小鼠卵母细胞获得减数分裂能力都是必需的。

为分析小鼠GV在兔卵细胞质中的减数分裂能力, 以观察兔卵细胞质对小鼠GV行为的影响, Li等^[11]将小鼠卵母细胞的GV移入兔去GV的卵母细胞中, 这样的重组卵有71.8%达到MII期, 当胞质内注射小鼠精子后, 59.4%排出第2极体。由于兔GV期的卵细胞质能支持小鼠GV的第1次和第2次减数分裂, 因此调控第1次和第2次减数分裂进程的细胞质因子如MPF在哺乳动物卵母细胞是非种属特异的^[11]。

通过将体细胞或胚胎干细胞(ES)核移入去核的MII期卵母细胞中已产生克隆动物, 表明只有在MII期或预激活后不久去核的卵母细胞能充分重新编程移入的细胞核, 合子的胞质被认为不适宜于核移植。为确定在GV期或前MI期去核的卵母细胞能否用做核移植的受体, 同时也确定GV物质对细胞核重塑是否是必需的, Gao等^[19]用ES核注入到不同的细胞质: GV期去核、再培养14h至MII期的细胞质, 前MI期去核、再培养13h至MII期的细胞质及MII期去核的细胞质, 构建了3种重组卵, 然后经Sr²⁺和CB激活处理, 观察其发育情况。结果表

明, GV 物质对核移植后细胞核的重塑是必需的, GV 期去核的卵母细胞在核移植后不能形成原核; 前 MI 期去核的卵母细胞在核移植后虽正常形成原核, 但极少的胚胎能卵裂并发育到桑椹胚(8.1%); 在 MII 期去核的卵母细胞在核移植后发育到桑椹胚的比率达 53.5%, 并有 5.3% 发育到期。这些结果表明在 GV 期或前 MI 期去核的卵母细胞不适宜用作核移植的受体^[19]。

5.2 研究卵母细胞质与减数分裂异常的关系

通过 GV 移植可用于研究卵母细胞减数分裂异常和与年龄相关变化之间的关系及细胞质衰老与卵母细胞非整倍性之间的关系。

在自然人口中, 随女性年龄的增长, 出现与生育力明显倒置的关系。当女性年龄超过 40 岁时妊娠率明显降低, 妊娠率下降与老龄妇女卵母细胞染色体非整倍性的发生上升有关^[20]。染色体分离异常与卵母细胞成熟后期第 1 次和 / 或第 2 次减数分裂异常有关, 是由于减数分裂期间二价染色体不分离的结果^[20,21]。衰老与非整倍性存在着明显的相关性, 但老龄动物卵母细胞非整倍性增加的原因仍不十分清楚, 纺锤体异常被认为是非整倍性结果的主要原因。虽然染色体的分离是由减数分裂纺锤体控制的, 但纺锤体的成分主要由细胞质提供, 因此已有人建议, 老龄个体卵母细胞纺锤体异常可能是一种或多种细胞质因子改变了, 由此产生了异常纺锤体成分和 / 或改变减数分裂各时期的时间, 从而导致微管不规则排列, 引起减数分裂纺锤体的结构异常, 最终导致染色体错误排列^[22,23]。即卵细胞质中负责减数分裂纺锤体组装的调控机制在老龄个体严重改变, 导致非整倍性的明显增加。Tarin 等^[24,25]也认为老龄个体的卵细胞质由于线粒体功能受损及随后引起的氧化应激增加而不能调控正常的减数分裂。因此目前流行的假说是: 在完成减数分裂期间细胞质因素最终负责二价染色体在细胞质和第一极体之间的对等分配。

由于缺乏检查细胞内每一成分的相关作用而使对正常减数分裂所必需的核 - 质相互作用的理解受到限制, 母体衰老对这些机制的影响同样也受到限制。然而应用 GV 移植, 可用于确定老龄个体卵母细胞非整倍性增加的细胞内因子和 / 或机制。由于可以在不同质量和年龄的卵母细胞之间进行 GV 互换, 所以 GV 移植可用于确定卵细胞质在染色体未分离中的作用, 以及细胞质的作用能否解决卵母细

胞成熟时呈现的遗传或发育异常即高龄妇女卵母细胞非整倍性的发生增加。既然目前的假设是细胞质因子影响减数分裂染色体的分离, 那么这种假设的重要生物学支持可由将老龄个体卵母细胞的 GV 移植到年轻个体去核的 GV 期卵母细胞中时观察到非整倍性发生率的下降而提供。已在人做了这方面的初步研究。Zhang 等^[5]将老龄人(大于 38 岁)的 GV 移入年轻人(小于 31 岁)去核的 GV 期卵母细胞中, 这样的重组 GV 期卵母细胞成熟到 MII 期时, 有 4/5 显示正常的核型, 而对照的老龄人卵母细胞只有 2/7 显示正常。同样 Takeuchi 等^[6]将老龄人(平均 37.5 岁)的 GV 移入年轻人(平均 30.0 岁)去核的 GV 期卵母细胞中, 成熟的重组卵有 2/2 显示正常的核型; 而年轻人的 GV 移入老龄人去核的 GV 期卵母细胞中, 这样的重组卵则有 2/3 显示异常的核型。结果似乎表明年轻人的细胞质能支持移入的老龄人 GV 的正常减数分裂, 相反, 老龄人的细胞质趋向诱导减数分裂染色体的异常分离^[6]。Palermo 等^[26]也报道在 7 个移入老龄人 GV 的重组卵中有 5 个呈现正常数量的染色体, 表明在年轻的细胞质中染色体正常分离。然而, 十分有限的卵母细胞分析尚不能定下结论: 当老龄个体 GV 在年轻个体细胞质成熟时非整倍性发生下降^[4]。不过, 用年轻的细胞质替换老龄的细胞质作为降低老龄个体卵母细胞非整倍性发生率的一种方式似乎是有希望的。从该角度出发, GV 移植也提供了一种卵母细胞捐赠的独特形式: 捐赠去核的细胞质。尽管卵母细胞捐赠已广泛用于治疗女性不育症, 但卵母细胞的受者只是她孩子的生物上的而不是遗传上的母亲。然而, 如果该女性卵母细胞的 GV 在由年轻捐赠者的去核卵母细胞内正常的体外成熟, 那她既是生物上又是遗传上的母亲了。

参考文献 (References)

- [1] Kono T *et al.* *Nat Genet*, 1996, **13**: 91
- [2] Takeuchi T *et al.* *Hum Reprod*, 1999, **14**: 1312
- [3] Liu H *et al.* *Hum. Reprod*, 1999, **14**: 2357
- [4] Moffa F *et al.* *Hum Reprod*, 2002, **17**: 178
- [5] Zhang J *et al.* *Fertil Steril*, 1999, **71**: 726
- [6] Takeuchi T *et al.* *Hum Reprod*, 2001, **16**: 730
- [7] Li GP *et al.* *Mol Reprod Dev*, 2001, **58**: 180
- [8] Li GP *et al.* *Theriogenology*, 2001, **56**: 855
- [9] Bao S *et al.* *Theriogenology*, 2003, **59**: 1231
- [10] Bao S *et al.* *Biol Reprod*, 2000, **62**: 616
- [11] Bao S *et al.* *Hum Reprod*, 2002, **17**: 1311
- [12] Liu H *et al.* *Hum Reprod*, 2000, **15**: 1997

- [13] Rickords LF *et al.* *Mol Reprod Dev*, 1992, **32**: 259
[14] Li GP *et al.* *J Exp Zool*, 2001, **289**: 322
[15] Eppig JJ. *Bioessays*, 1991, **13**: 569
[16] Eppig JJ *et al.* *Mol Reprod Dev*, 1993, **34**: 450
[17] Xia G *et al.* *Mol Reprod Dev*, 1994, **39**: 17
[18] Allworth AE *et al.* *Dev Biol*, 1993, **158**: 101
[19] Gao S *et al.* *Biol Reprod*, 2002, **67**: 928
[20] Dailey T *et al.* *Am J Hum Genet*, 1996, **59**: 176
[21] Moore DP *et al.* *Curr Top Dev Biol*, 1998, **37**: 263
[22] Gaulden ME. *Mutat Res*, 1992, **296**: 69
[23] Battaglia DE *et al.* *Hum Reprod*, 1996, **11**: 2217
[24] Tarin JJ. *Hum. Reprod*, 1995, **10**: 1563
[25] Tarin JJ *et al.* *Mol Hum Reprod*, 1998, **4**: 281
[26] Palermo GD *et al.* *Hum Reprod*, 2002, **17**: 2165

Germinal Vesicle Transfer of Mammalian Oocytes

Long-Bo Cui*, Fang-Zhen Sun¹

(Department of Biochemistry, Yantai University, Yantai 264005, China;

¹Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract Germinal vesicle (GV) transfer is a technique that GV in GV oocyte is removed and inserted into the perivitelline space of the enucleated oocyte (GV oocyte, MII oocyte or fertilized egg), forming a reconstructed oocyte by fusion. GV transfer may be a valuable research procedure that generates cell models to characterize the cytoplasmic-nuclear interplay for cell cycle regulation, maturation, and fertilization in oocytes. It can be used to study the relationship between meiotic errors and aged-related changes in the oocytes and between oocytoplasmic ageing and oocyte aneuploidy. This paper reviews general procedure of GV transfer, fusion of GV-karyoplast and cytoplasm, cultural conditions of the reconstructed oocytes, fertilization, artificial activation and developmental capacity of the matured reconstructed oocytes and significance of GV transfer.

Key words germinal vesicle; nuclear transfer; meiosis

Received: April 13, 2004 Accepted: June 18, 2004

This work was supported by the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program) (No.G1999055902)

*Corresponding author. Tel: 86-535-6903037, Fax: 86-535-6902063, E-mail: lbcui@163.com

第五届海峡两岸细胞生物学研讨会将在福建武夷山召开

第五届海峡两岸细胞生物学研讨会定于2005年10月29~30日在福建武夷山国际远华大酒店召开。本届研讨会由中国细胞生物学学会主办,福建省细胞生物学学会、福建省生物工程学会协办。会议总人数不超过50人。每位参会者均作学术报告。研讨会将围绕细胞分化与发育生物学、干细胞与组织工程、基于细胞的系统生物学研究、细胞信号转导和疾病的细胞与分子机制等5个主题分别进行学术交流,每个主题由双方各推荐一名专家做主持人。

这次会议的学术水平较高,双方参会者均为该学术领域中的佼佼者。欢迎积极参加。

详情请见 <http://www.cscb.org.cn>。