

猪卵母细胞不同孤雌激活方法

胡军和^{1,2} 徐小明¹ 杨春荣¹ 窦忠英^{1*}

(¹ 西北农林科技大学, 国家干细胞工程研究中心陕西分中心, 杨凌 712100;

² 榆林学院生命科学学院, 榆林 719000)

摘要 研究了离子霉素、电场强度、电脉冲次数和电刺激-化学联合激活对猪卵母细胞孤雌激活的影响, 以出现分裂球为激活的标准。结果表明: (1) 10 $\mu\text{mol/L}$ 离子霉素处理 5 min 的激活率 62.97%(17/27)与处理 10 min、15 min 的激活率 62.50%(15/24)、65.21%(15/23)差异不显著 ($P>0.05$)。 (2) 以电场强度 120 V/mm, 脉冲次数 3 次处理猪卵母细胞的激活率 66.67%(30/45)与 60 V/mm、80 V/mm、100 V/mm 的激活率 40.98%(17/42)、44.11%(15/34)、46.19%(18/39)有显著差异 ($P<0.05$), 但与 140 V/mm、160 V/mm 的激活率 63.89%(23/36)、64.10%(25/39)无显著差异 ($P>0.05$)。 (3) 以电场强度 120 V/mm, 不同电脉冲次数进行激活。以 2 次电脉冲激活猪卵母细胞的激活率 67.40%(31/46)与 1 次、3 次电脉冲的激活率 62.80%(27/43)、68.30%(28/41)无显著差异 ($P>0.05$)。 (4) 以电场强度 120 V/mm, 2 次电脉冲与 10 $\mu\text{mol/L}$ 离子霉素处理 5 min 联合激活猪卵母细胞的激活率 84.84%(29/33)与只用电场强度 120 V/mm, 2 次电脉冲的激活率 67.64%(23/34)差异显著 ($P<0.05$)。实验结果表明: 电场强度 120 V/mm, 2 次电脉冲与 10 $\mu\text{mol/L}$ 离子霉素处理 5 min 联合处理激活能有效提高猪卵母细胞孤雌激活的激活率。

关键词 猪; 卵母细胞; 孤雌激活; 电激活

自然情况下或体外受精时, 精子的进入会启动 MII 期卵母细胞继续发育, 这一过程称为卵母细胞的激活。卵母细胞的激活包括一系列级联发生的形态和生理变化。钙离子振荡和钙波是激活过程的初始信号, 随后引起包括皮质颗粒(CG)释放、细胞内 pH 改变、母源 mRNA 的补充等一系列激活反应, 最终导致原核形成、DNA 合成起始和卵裂^[1]。在体外也可以通过物理刺激和化学刺激使处于 MII 期的卵母细胞激活。物理激活一般有温度刺激和机械刺激, 化学刺激一般有蛋白质合成抑制剂及蛋白质磷酸化抑制剂、离子载体处理、酶刺激等。从目前应用情况看, 电脉冲刺激是应用最为广泛的卵母细胞激活方法, 此外乙醇、钙离子载体、6-DMAP、CHX(放线菌酮)等也可用于卵母细胞激活^[2,3]。对于猪卵母细胞的激活而言, 有使用化学试剂激活卵母细胞的报道^[4], 但大多学者仍倾向于使用电激活, 并认为电激活足以使猪卵母细胞充分激活^[5]。但是采用单纯电刺激激活的卵母细胞孤雌胚大多为单倍体, 影响其发育。因此, 为了提高孤雌激活胚胎的发育率, 常常将电刺激与化学激活联合起来, 使得孤雌激活胚胎为二倍体。本实验的目的是通过对离子霉素不同处理时间、一些不同电激活参数及电

激活-化学联合的研究, 确定适合于猪卵母细胞孤雌激活的方法, 为进行进一步研究积累资料。

1 材料与方法

1.1 材料

研究中所用试剂除特别指明外, 均购自 Sigma 公司。TCM199 粉剂及 TCM199 原液购自 Gibco BRL 公司; FBS 购自 Hyclone 公司; PMSG、HCG、FSH 购自宁波激素制品厂; 洗卵液为添加 10% NBS 的 PBS(-)(自配)。电融合液(Cytofusion medium, Formula C)和电融合仪(PA-4000 型)购自 Cyto Pulse Sciences 公司; NCSU-23 自配(配 1000 ml 含 6.35 g NaCl, 0.356 g KCl, 0.162 g KH_2PO_4 , 0.294 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.106 g NaHCO_3 , 0.146 g Glutamine, 1.0 g Glucose, 0.876 g Taurine, 0.545 g Hypotaurine, 0.189 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4.0 g BSA(F-5), 1.0 ml 0.5% Phenol Red, 0.078125 g Penn, 0.1 g Strep, 0.1 g Cysteine)。

收稿日期: 2005-01-19 接受日期: 2005-03-03

国家重点基础研究发展规划项目(973 计划)(No.G19990543301), 国家高技术研究发展计划项目(863 计划)(No.2002AA216161)资助

* 通讯作者。Tel: 029-87012124, Fax: 029-87092599, E-mail: douzhongying@china.com

1.2 猪卵巢的采集及运输

猪卵巢采集于兴平某屠宰场,采集卵巢个体的年龄、遗传背景、妊娠与否不详。采集卵巢置于35~39℃加双抗的生理盐水中,4 h内运回实验室。

1.3 猪卵母细胞的采集与体外成熟培养

用抽吸法采集卵巢卵母细胞。去除卵巢上附着的输卵管等组织,用加双抗生理盐水清洗3次后,用带有12#针头的10 ml注射器抽吸卵巢表面2~8 mm卵泡的卵泡液,在体视显微镜下检出卵母细胞。检卵时按卵丘细胞多少及胞质明暗分为3类:A类卵母细胞含有5层以上卵丘细胞,胞质均匀较暗;B类卵母细胞包有1~4层卵丘细胞;C类为胞质不均或只有少许卵丘细胞的畸型卵、裸卵和半裸卵。选择A、B类卵母细胞,用洗卵液和成熟培养液分别清洗3次后进行体外成熟培养。成熟培养液为改良TCM199(TCM199添加0.1%PVA,0.57 mmol/L半胱氨酸,3.05 mmol/L葡萄糖和0.91 mmol/L丙酸钠)+10 IU/ml PMSG+10 IU/ml hCG+2.5 IU/ml FSH。培养条件为39℃、5%CO₂和饱和湿度。培养44 h后用0.3%透明质酸酶(无Ca²⁺、Mg²⁺的PBS液配制)37℃消化3~5 min,辅以适当口径玻璃管反复吹打去除卵丘细胞判定成熟情况。卵母细胞成熟以排出第一极体为标准,并结合成熟卵形态学进行评价。

1.4 猪卵母细胞的孤雌激活与体外培养

对成熟的卵母细胞依实验设计进行化学激活,依照实试验设计用10 μmol/L离子霉素处理后用培养液洗3次,然后用2 mmol/L 6-DMAP处理后再用培养液洗3次。依实验设计对猪卵母细胞进行电激活。激活前用融合液洗3次,并在融合液中38.5℃培养5~10 min。激活后将卵母细胞用培养液洗3次后置含7.5 μg/ml细胞松弛素B(CCB)的培养液中培养2 h,再用培养液洗3次。其激活的卵母细胞用含4%BSA的NCSU-23进行培养。培养40 h统计卵裂数,以出现分裂球为激活的标准。

1.5 实验设计

1.5.1 实验1 实验目的是研究离子霉素不同处理时间对孤雌激活的影响。用10 μmol/L离子霉素分别处理成熟的卵母细胞5、10、15 min,然后用含2 mmol/L 6-DMAP的4%BSA NCSU-23进行培养2 h。激活后用NCSU-23+4%BSA培养,每2天半量换液1次。

1.5.2 实验2 实验目的是研究电场强度对猪卵母细胞激活的影响。直流脉冲之前给1个10 V,5 s的交流脉冲,之后给予时程为60 μs,3次间隔3 s的直流脉冲,直流脉冲分6组,分别为60 V/mm、

80 V/mm、100 V/mm、120 V/mm、140 V/mm和160 V/mm。激活对象为体外成熟培养44 h的卵母细胞。激活后培养同实验1.5.1。

1.5.3 实验3 实验目的是研究脉冲次数对猪卵母细胞激活的影响。直流脉冲前给1个10 V,5 s的交流脉冲,之后分三组分别给予1次、2次和3次120 V/mm时程为60 μs的直流脉冲,每次脉冲间隔3 s。激活对象为IVM 44 h的卵母细胞。激活后培养同实验1.5.1。

1.5.4 实验4 实验目的是研究电激活与化学联合激活对猪卵母细胞激活的影响。从实验2、3中选择直流脉冲为120 V/mm、直流脉冲参数为2次进行电激活,然后用细胞松弛素B处理2 h。同时,在电激活处理后从实验1中选择10 μmol/L离子霉素处理5 min、2 mmol/L 6-DMAP再对电激活的卵母细胞处理2 h。激活后培养同实验1.5.1。

1.6 数据资料处理

用*t*检验对结果进行差异显著性分析。

2 结果

2.1 离子霉素处理不同时间对猪卵母细胞激活的影响

依实验设计中实验1进行操作,结果见表1。

2.2 电场强度对猪卵母细胞激活的影响

依实验设计中实验2进行操作,结果见表2。

2.3 电脉冲次数对猪卵母细胞激活的影响

依实验设计中实验3进行,结果见表3。

2.4 电激活和电激活-化学联合激活对猪卵母细胞激活的影响

依实验设计中实验4进行,结果见表4。

表1 离子霉素不同处理时间对猪卵母细胞激活的影响

处理时间(min)	处理卵数(<i>n</i>)	裂解卵数(%)	卵裂胚数(%)
5	27	0(0.0) ^a	17(62.97) ^a
10	24	0(0.0) ^a	15(62.50) ^a
15	23	0(0.0) ^a	15(65.21) ^a

同列上标字母不同表示有显著性差异, $P>0.05$ 。

表2 电场强度对猪卵母细胞激活的影响

电场强度(V/mm)	处理卵数(<i>n</i>)	裂解卵数(%)	卵裂胚数(%)
60	42	0(0.0) ^a	17(40.98) ^a
80	34	0(0.0) ^a	15(44.11) ^a
100	39	0(0.0) ^a	18(46.19) ^a
120	45	0(0.0) ^a	30(66.67) ^b
140	36	3(8.3) ^a	23(63.89) ^b
160	39	5(12.8) ^a	25(64.10) ^b

同列上标字母不同表示有显著性差异, a 和 b, $P<0.05$ 。

表3 电脉冲次数对猪卵母细胞激活的影响

脉冲次数(n)	处理卵数(n)	裂解卵数(%)	卵裂胚数(%)
1	43	0(0.0) ^a	27(62.80) ^a
2	46	0(0.0) ^a	31(67.40) ^a
3	411	1(2.4) ^a	28(68.30) ^a

同列上标字母不同表示有显著性差异, $P>0.05$ 。

表4 电激活和电激活-化学联合激活对猪活卵母细胞激活的影响

激活方法	培养胚数(n)	裂解卵数(%)	卵裂胚胎数(%)
电激活	34	0(0.0) ^a	23(67.64) ^a
激活-化学激活	33	0(0.0) ^a	29(84.84) ^b

同列上标字母不同表示有显著性差异, a 和 b, $P<0.05$

3 讨论

3.1 离子霉素处理不同时间对猪卵母细胞激活的影响

实验1中用10 $\mu\text{mol/L}$ 离子霉素处理不同时间结合用2 mmol/L 6-DMAP进行激活都获得了60%以上的激活率,说明它们能有效的使猪卵母细胞激活。离子霉素是一种高效的 Ca^{2+} 载体,能够动员细胞内 Ca^{2+} 的释放,并且依次激发后期 Ca^{2+} 的内流^[6],引起细胞内 Ca^{2+} 的升高,使得卵母细胞退出MII其被激活^[7]。但是离子霉素一般只引起激活的早期反应,因此要与蛋白质合成抑制剂联合使用如6-DMAP或CHX等^[8]。因为6-DMAP是蛋白质磷酸化的抑制剂,它能阻止蛋白质的磷酸化而抑制促成熟因子(MPF)和细胞静止因子(CSF)的活性,同时抑制了纺锤体形成时微管蛋白的磷酸化而抑制了极体排出,使得形成二倍体^[9]。另外,6-DMAP对卵母细胞的激活作用在于维持p34^{cdc2}的磷酸化和抑制cyclinB的磷酸化,抑制MPF的活性,同时cyclinB的降解使得MPF活性下降,使得卵母细胞由MII期向末期发展,导致激活^[10]。因为离子霉素处理时间短,但是往往在实验中同时要要进行其他实验,很难保证离子霉素处理时间很精确。因此,实验1在研究离子霉素处理在一定时间内波动对激活率有何影响。结果发现离子霉素处理5 min与10 min、15 min无显著差异,说明在5~15 min内,其卵母细胞内渗入的离子霉素的量造成的细胞内 Ca^{2+} 的升高对激活率的影响无显著差异。

3.2 电场强度对猪卵母细胞激活的影响

实验2中以电场强度120 V/mm、脉冲次数3次处理猪卵母细胞的激活率66.67%(30/45)与60 V/mm、80 V/mm、100 V/mm的激活率40.98%(17/

42)、44.11%(15/34)、46.19%(18/39)有显著差异,但与140 V/mm、160 V/mm的激活率63.89%(23/36)、64.10%(25/39)无显著差异。电脉冲激活卵母细胞并非是电脉冲本身激活了卵母细胞,而是电脉冲在卵母细胞膜上形成可恢复的微孔使 Ca^{2+} 进入细胞内,使细胞内游离的 Ca^{2+} 浓度迅速升高,引起卵母细胞的激活。电刺激激活卵母细胞过程中,场强及脉冲时程是两个重要的物理参数。实验2结果表明,在一定场强范围内,随着场强的增加,激活猪卵母细胞的分裂率也相应增加,但电场强度高则会导致卵母细胞裂解率也相应增多,此结果与谭景和等^[11]和陈乃清等^[12]的研究结果一致。对各组进行比较,在电场强度为120 V/mm,3次电脉冲和60 μs 脉冲时程的电刺激可以对IVM 44 h的猪卵母细胞得到较好的激活效果。对于脉冲时程,本实验中没有对脉冲时程进行比较,而是直接参考其他学者的参数(30~100 μs)^[5,13~15]。

3.3 脉冲次数对猪卵母细胞激活的影响

实验3中以2次电脉冲激活猪卵母细胞的激活率67.40%(31/46)与1次、3次电脉冲的激活率62.80%(27/43)、68.30%(28/41)无显著差异。在电脉冲作用下,卵母细胞的细胞膜会形成很多可恢复的微孔,使细胞内外介质中的 Ca^{2+} 进入细胞,使胞内 Ca^{2+} 浓度升高,从而引起卵母细胞激活。多次电刺激可诱导卵母细胞中 Ca^{2+} 浓度多次升高^[16]。在正常受精过程中,精子引起卵母细胞内 Ca^{2+} 浓度升高并伴随着一系列 Ca^{2+} 振荡,持续时间长达数小时。控制电刺激参数,模拟正常受精过程中 Ca^{2+} 浓度节律性脉冲升高,可复制出正常受精过程中的一系列变化^[17]。但对猪卵母细胞激活而言,越来越多的研究表明,随着脉冲次数增多,卵母细胞激活率并不显著升高^[14],并且随着脉冲次数增加,卵母细胞裂解率也增加。本实验结果与其他学者的结果基本相同,但以2次电脉冲取得较好结果。

3.4 电激活-化学联合激活对猪卵母细胞激活的影响

实验4中以电脉冲与化学方法处理联合激活猪卵母细胞的激活率84.84%(29/33)与只用电脉冲激活猪卵母细胞的激活率67.64%(23/34)差异显著。在孤雌激活研究中,一般采用单纯电刺激激活的卵母细胞孤雌胚大多为单倍体,影响其发育^[8]。因此,为了提高孤雌激活胚胎的发育率,常常将电刺激与化学激活联合起来进行激活^[18]。Wakayama^[19]研究发现电激活后再用化学激活能显著提高克隆胚的发育。实验结果表明电激活-化学联合激活卵母细胞的激活率高于单纯电刺激激活的激活率。两种的区

别在于前者附加了离子霉素和 6-DMAP 的处理,而现在的文献中的电激活-化学联合激活一般没有附加离子霉素的处理^[20,21]。究其原因,个人认为激活会随着电场强度的升高其激活率也会升高,但是其卵裂解率也呈上升趋势。实验 2 中电场强度 140 V/mm、160 V/mm 的激活率(63.89%, 64.10%)分别与其卵裂解率(8.3%, 12.8%)之和高于电场强度 120 V/mm 的激活率(66.67%),有可能在于高的电场强度对一些卵母细胞胞质膜造成的微孔无法恢复,从而使得一些将分裂的卵母细胞裂解,使其激活率下降。在适当的电激活后,再用离子霉素处理有可能弥补细胞内 Ca^{2+} 浓度不够和用高的电场强度造成的损害,使得激活率高于单纯电激活的激活率。但是,其获得的孤雌激活胚未进行染色体及 DNA 的分析,不能确定是否为二倍体。因此用电激活-化学联合激活能有效提高猪卵母细胞孤雌激活的激活率,但是否能提高孤雌胚的发育率有待进一步的研究。

参考文献 (References)

- [1] 陈大元等。受精生物学——受精机制与生殖工程,北京:科学出版社,2000,199
- [2] Jung T *et al.* *J Reprod Fertil*,1993, **98**: 529
- [3] Prather RS *et al.* *Theriogenology*, 1999, **51**: 487
- [4] Kuhholzer B *et al.* *Theriogenology*, 2001, **55**: 276
- [5] Bondioli K *et al.* *Mol Reprod Dev*, 2001, **60**: 189
- [6] Morgan AJ *et al.* *Biochem J*, 1994, **300**: 665
- [7] Jones KT *et al.* *J Biol Chem*, 1995, **270**: 6671
- [8] Loi P *et al.* *Biol Reprod*, 1998, **58**: 1177
- [9] Ledda S *et al.* *Zygote*, 1996, **4**: 7
- [10] Mau JC *et al.* *Theriogenology*, 2001, **55**: 457
- [11] 谭景和等。动物学报, 1995, **41**: 327
- [12] 陈乃清等。武汉大学学报(自然科学版), 1999, **45**: 463
- [13] Polejaeva LA *et al.* *Nature*, 2000, **407**: 86
- [14] Onishi A *et al.* *Science*,2000, **289**: 1188
- [15] Koo DB *et al.* *Theriogenology*, 2000, **53**: 439
- [16] Sun FZ *et al.* *Development*, 1992, **115**: 947
- [17] Ozil JP *et al.* *Development*, 1990, **109**: 117
- [18] Zhu J *et al.* *Biol Reprod*, 2002, **66**: 635
- [19] Wakyama T. *Nature*, 1998, **394**: 369
- [20] 孙兴参等。中国农业科学, 2004, **37**: 431
- [21] 蔡元等。中国农业大学学报, 2004, **9**: 21

Different Methods of Parthenogenetic Activation on Porcine Oocytes

Jun-He Hu^{1,2}, Xiao-Ming Xu¹, Chun-Rong Yang¹, Zhong-Ying Dou^{1*}

(¹Shaanxi Province Branch Center of National Stem Cell Engineering & Technology Center,
Northwest Sci-tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China;

²Department of Life Science, Yulin College, Yulin 719000, China)

Abstract The effects of ionomycin, electrical field strength, numbers of electrical pulse and electrical stimulation in combination with chemical stimulation on parthenogenetic activation of porcine oocytes were studied. The results are as follows: (1) The activation rate with 10 $\mu\text{mol/L}$ ionomycin dealing 5 min (62.97%, 17/27) was not significantly different from that of dealing 10 min (62.50%, 15/24), 15 min (65.21%, 15/23). (2) The activation rate with three times electrical stimulation of 120 V/mm for 60 μs (66.67%, 30/45) was significantly higher than that of electrical stimulation of 60 V/mm (40.98%, 17/42), 80 V/mm (44.11%, 15/34), 100 V/mm (46.19%, 18/39), but was not significantly different from that of 140 V/mm (63.89%, 23/36), 160 V/mm (64.10%, 25/39). (3) The activation rate with two times electrical stimulation of 120 V/mm for 60 μs (67.40%, 31/46) was not significantly different from that of one time electrical stimulation (62.80%, 27/43), three times electrical stimulation (68.30%, 28/41). (4) The activation rate with three times electrical stimulation of 120 V/mm for 60 μs in combination with 10 $\mu\text{mol/L}$ ionomycin dealing 5 min (84.84%, 29/33) was significantly higher than that of two times electrical stimulation of 120 V/mm for 60 μs alone (67.64%, 23/34). The results of this experiment showed that two times electrical stimulation of 120 V/mm for 60 μs in combination with 10 $\mu\text{mol/L}$ ionomycin dealing 5 min can efficiently activate porcine oocytes.

Key words porcine; parthenogenetic activation; oocytes; electrical stimulation

Received: January 19, 2005

Accepted: March 3, 2005

This work was supported by the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program) (No.G19990543301) and the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No.2002AA216161)

*Corresponding author. Tel: 86-29-79012124, Fax: 86-29-87092559, E-mail: douzhongying@china.com