

年轻与老龄小鼠未成熟卵母细胞之间的生发泡移植

崔龙波* 周雪莹 黄秀英¹ 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 为研究不同年龄来源的细胞质或细胞核对卵母细胞成熟、钙振荡及核型的影响, 在 6~8 周龄(6W)小鼠与 9 月龄(9M)和 12 月龄(12M)小鼠卵母细胞之间进行了生发泡(GV)互换。通过显微操作和电融合获得了 5 组重组卵母细胞。重组卵母细胞和对照卵母细胞经 Sr^{2+} 诱导后呈现相似的钙震荡模式。6W GV-6W 胞质体组、6W GV-9M 胞质体组和 6W GV-12M 胞质体组成熟卵母细胞染色单体提早分离的比率与 6~8 周龄对照组比较无差异($P>0.05$), 但显著低于 12 月龄对照组($P<0.01$)。而 9M GV-6W 胞质体组和 12M GV-6W 胞质体组成熟卵母细胞染色单体提早分离的比率则明显增加。这些结果表明由年轻与老龄小鼠之间 GV 互换所重组的卵母细胞能够正常成熟和产生钙震荡, 与衰老相关的减数分裂异常似乎归因于细胞核或染色体而不是细胞质。

关键词 年龄; 卵母细胞; 生发泡移植; 钙震荡; 染色体

与衰老相关的雌性生育力下降是老龄妇女的生理现象^[1]。已证明母源性衰老影响卵母细胞的质量及早期胚胎发育^[2]。在人, 已充分认识到卵母细胞和胚胎的非整倍性随年龄增长而显著增加^[3]。大多数与母源性衰老有关的非整倍性据认为起源于第一次减数分裂开始的未分离和减数分裂错误^[4]。在动物卵母细胞, 核基因组与细胞质内众多因子的相互作用影响着减数分裂——染色体数由生发泡(germinal vesicle, GV)期的 4N 降为第二次减数分裂中期(metaphase II, MII)的 2N。由于缺乏检查细胞内某一成分的相关作用而使人们对正常减数分裂所必需的核-质相互作用的理解受到限制, 母源性衰老对这些机制的影响同样也受到限制。

应用显微操作和电融合通过将GV移入到来自同一发育时期去核的供体卵母细胞的细胞质(胞质体)中可以重组卵母细胞, 因此, GV 移植是研究卵母细胞减数分裂过程中核-质相互作用以及减数分裂异常及其与年龄相关变化之间关系的有效手段^[5-7]。在小鼠, 已表明 GV 移植可以高效完成, 并且这一技术似乎不影响随后的卵母细胞成熟或增加染色体异常的发生^[8]。在人, 已有学者建议将老龄个体卵母细胞的 GV 移入到染色体分离之前的年轻个体卵细胞质中作为预防非整倍性的一条途径^[9]。然而, 由于仅有少量的人卵母细胞可用于这一研究工作, 对人重组卵母细胞减数分裂成熟及调控的研究受到很大的限制。

本研究中我们以小鼠为模型, 研究了在年轻小鼠(6~8 周龄)与老龄小鼠(9 月龄和 12 月龄)之间由 GV 移

植重组的 GV 期卵母细胞的体外成熟、早期胚胎发育、钙振荡及核型变化, 目的在于提供一个有价值的细胞模型——研究细胞质和细胞核在卵母细胞正常减数分裂的相互作用以及母源性衰老对这些机制的影响。

1 材料与方法

1.1 动物

4 周龄雌性昆明小白鼠购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物科学研究所, 饲养于控温、控光(14 h 光: 10 h 暗的光周期)室内, 分别喂养至 6~8 周龄、9 月龄和 12 月龄。

1.2 卵母细胞收集

每只小鼠腹腔注射 7.5 IU 的孕马血清促性腺激素(PMSG, 中国宁波激素制品厂), 46~48 h 后断颈处死小鼠, 取出卵巢, 用 5F 解剖针刺破卵泡, 释放出 GV 期卵母细胞, 用内径与卵母细胞直径相当的玻璃管反复吹打至颗粒细胞从卵母细胞上脱离。卵母细胞的收集均在 M_2 培养液(Sigma)中进行。

1.3 显微操作

在显微操作前, GV 期卵母细胞于含有 10% 胎牛血清(FCS)(HyClone)和 50 $\mu\text{g/ml}$ IBMX (Sigma)的人小管液体(HTF)培养液(Irvine Scientific)中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、

收稿日期: 2006-08-01 接受日期: 2006-11-17

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: 0535-6903162, Fax: 0535-6902063, E-mail:

lbcai@163.com

5% CO₂ 培养箱内温育 2 h, 从而形成卵周隙。将形成卵周隙的 GV 期卵母细胞转入含 10% FCS、50 μg/ml IBMX 和 25 μg/ml 细胞松弛素 B(Sigma)的 HEPES 缓冲的 HTF 培养液(Irvine Scientific)中室温温育 30 min。用切口针对卵母细胞的透明带进行切口, 然后用内径为 20 μm 的移核管从透明带切口处进入卵周隙并靠近 GV, 吸取由少量胞质包裹的 GV(GV 核体), 然后将 GV 核体转移到另一去除 GV 的 GV 期卵母细胞(胞质体)的卵周隙内, 形成 GV-胞质体复合体。用 M₂ 培养液洗涤 5 次 GV-胞质体复合体, 转入含 10% FCS 的 M₂ 培养液中 37 °C 恢复 30 min, 然后进行细胞融合。

1.4 电融合

使用电细胞操作仪(BTX 2000, BTX Inc.)进行融合。融合液为 M₂ 培养液。将单个的 GV-胞质体复合体移入两个微电极之间, 人工排列定位复合体。融合参数: 电场强度为 160 V/cm, 持续时间为 90 μs, 1 次电脉冲刺激。电刺激后的 GV-胞质体复合体转入含 10% FCS 的 M₂ 培养液内, 37 °C 培养, 30 min 后观察 GV 核体与胞质体融合情况。

1.5 实验设计

应用显微操作和电融合在不同年龄小鼠的 GV 期卵母细胞之间进行 GV 互换, 产生下列 5 组重组卵母细胞: 6~8 周龄小鼠卵母细胞的 GV 与 6~8 周龄小鼠卵母细胞的胞质体(6W GV-6W 胞质体), 6~8 周龄小鼠卵母细胞的 GV 与 9 月龄小鼠卵母细胞的胞质体(6W GV-9M 胞质体), 9 月龄小鼠卵母细胞的 GV 与 6~8 周龄小鼠卵母细胞的胞质体(9M GV-6W 胞质体), 6~8 周龄小鼠卵母细胞的 GV 与 12 月龄小鼠卵母细胞的胞质体(6W GV-12M 胞质体), 以及 12 月龄小鼠卵母细胞的 GV 与 6~8 周龄小鼠卵母细胞的胞质体(12M GV-6W 胞质体)。每组重复实验 5 次以上。3 组对照卵母细胞(6~8 周龄、9 月龄和 12 月龄小鼠)未经过显微操作和电融合处理。

1.6 体外成熟

融合后的重组卵母细胞移入到含 10% FCS 的 HTF 培养液中, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养, 17~18 h 后检查卵母细胞的成熟情况。取排放出第一极体的卵母细胞进行后述实验。

1.7 钙的检测

本实验使用 MiraCal Imaging System(Life Science Resources)进行细胞内游离钙浓度的检测及钙图象分析, 获取图象及分析由 Life Science Resources 提

供的软件 MiraCal Version 2.3 完成。这一系统检测细胞内的游离 Ca²⁺ 浓度的基本原理是: 钙离子荧光探针 Fura-2/AM 在结合 Ca²⁺ 后, 其激发波长由未结合时的 380 nm 转变为 340 nm, 由 CCD 采集分别由 340 nm 和 380 nm 激发的发射荧光(510 nm)密度, 两个发射荧光密度的比值再由计算机按照计算公式^[10]换算为细胞内游离 Ca²⁺ 的浓度。计算公式中的参数获得和系统校准按 Poenie 等^[11]所述方法进行。

检测前卵母细胞先在含 2 μmol/L Fura-2/AM (Molecular Probes Inc.) 的 H6 液中 37 °C 标记 30 min^[12]。然后将卵母细胞用 H6 液洗涤 3 次, 转入含 20 mmol/L SrCl₂ 的无 Ca²⁺ H6 液(50 μl, 覆盖以轻质石蜡油)的小室中。将小室放在 Nikon Diaphot 200 倒置荧光显微镜(Nikon Instruments)载物台上的小井内以用于成像, 并由一温度控制器(Life Sciences Resources)维持小室温度在 37 °C。钙图像每 10 s 记录一次, 连续检测 6 h。

1.8 细胞遗传学检查

为了解重组卵母细胞的减数分裂能否由 GV 期正常成熟到 MII 期, 按 Dyban^[13]和 Rybouchkin 等^[14]所述方法对排出第一极体的卵母细胞进行细胞遗传学分析。卵母细胞在 0.068 mmol/L KCl 溶液(含 1 mg/ml BSA)中于 4 °C 处理 20 min 至 2 h, 移入 -20 °C 预冷的固定液(甲醇:冰乙酸 = 3:1)中, 室温固定 30 s。然后将卵母细胞移到载玻片上, 在固定液挥发前, 立即滴加 4 次甲醇:75%冰乙酸(1:1), 空气干燥, 用 2% 吉姆萨(Giemsa)(pH 6.8)着染 20 min。镜检确定染色体的数量和结构。

1.9 数据分析

用 χ^2 检验对实验数据进行统计学分析, $P < 0.05$ 时确定为差异显著。

2 结果

2.1 GV 移植卵母细胞的成熟

由不同年龄小鼠的 GV 期卵母细胞组成的 5 组 GV-胞质体复合体的融合率为 89.7%~94.3%(每组实验卵数在 150 个以上), 5 组 GV-胞质体复合体的融合率相互比较无显著差异($P > 0.05$)。体外培养 17~18 h 后, 5 组重组卵母细胞的成熟率(以排放出第一极体为标志)为 84.7%~88.2%, 5 组重组卵母细胞的成熟率之间相互比较以及与 3 组对照卵母细胞的成熟率(88.4%~89.2%, 每组卵数在 100 个以上)比较均无显著差异($P > 0.05$)。

2.2 重组卵母细胞的钙振荡

用 20 mmol/L SrCl₂ 处理成熟的重组卵母细胞在大多数受检的卵母细胞中诱发钙振荡(表 1)。钙振荡的平均基础值为 97 ± 14~103 ± 13 nmol/L, 平均峰值为 352 ± 44~368 ± 27 nmol/L, 平均间隔时间为 391 ± 71~410 ± 65 s, 钙振荡持续 4~6 h。5 个实验组和 3 个对照组的卵母细胞呈现相似的钙振荡模式, 其 Ca²⁺ 幅值、持续时间及间隔时间均无差异(表 1)。

2.3 重组卵母细胞的细胞遗传学分析

从 351 个重组的成熟卵母细胞中成功制备出具有确切染色体数目的 181 个卵母细胞, 其细胞遗传学分析如表 2 所示。染色体的数目为 20、19 和 18 条, 少数染色体数少于 18 条的卵母细胞被排除在分析之外。5 组重组卵母细胞具 20 条染色体的比率分别为 90.7%、79.3%、79.3%、82.4% 和 80.0%(图 1a), 5 组之间以及与 3 组不同年龄对照组比较均无显著差异($P>0.05$)。

我们还发现在某些成熟的卵母细胞有 1~4 条染色体的两条染色单体分离, 形成 2~8 条散在的染色单体(图 1b)。6W GV-6W 胞质体、6W GV-9M 胞质体和 6W GV-12M 胞质体 3 组重组卵母细胞含染色单

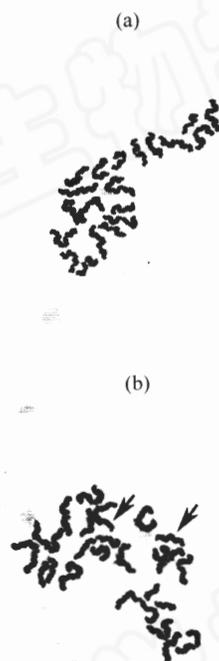


图 1 细胞遗传学分析

(a) 6W GV-6W 胞质体组的卵母细胞具 20 条染色体; (b) 12M GV-6W 胞质体组的卵母细胞具 20 条染色体, 其中一条分离成两条无联系的染色单体(箭头)。吉姆萨染色(1000 ×)。

表 1 Sr²⁺ 在重组卵母细胞诱导的钙振荡

GV-胞质体复合体类型	处理卵数	发生 Ca ²⁺ 振荡的卵数	Ca ²⁺ 基础值 (nmol/L)	Ca ²⁺ 峰值 (nmol/L)	Ca ²⁺ 峰持续时间 (s)	Ca ²⁺ 峰间隔时间 (s)	前 2 h 内检测到的 Ca ²⁺ 峰数
6W GV-6W 胞质体	26	24	100 ± 11 ^a	368 ± 27 ^b	170 ± 38 ^c	391 ± 71 ^d	20.1 ± 2.5 ^e
6W GV-9M 胞质体	25	23	102 ± 15 ^a	357 ± 30 ^b	173 ± 31 ^c	401 ± 59 ^d	19.5 ± 3.0 ^e
9M GV-6W 胞质体	24	23	99 ± 14 ^a	360 ± 41 ^b	169 ± 36 ^c	410 ± 65 ^d	19.6 ± 3.2 ^e
6W GV-12M 胞质体	21	19	103 ± 13 ^a	352 ± 44 ^b	166 ± 32 ^c	400 ± 68 ^d	18.7 ± 2.8 ^e
12M GV-6W 胞质体	22	20	97 ± 14 ^a	362 ± 37 ^b	161 ± 41 ^c	398 ± 63 ^d	19.2 ± 3.2 ^e
6W 对照	29	29	98 ± 17 ^a	364 ± 42 ^b	172 ± 39 ^c	416 ± 75 ^d	19.1 ± 2.7 ^e
9M 对照	30	30	101 ± 14 ^a	355 ± 43 ^b	181 ± 40 ^c	409 ± 71 ^d	20.1 ± 2.8 ^e
12M 对照	27	27	105 ± 16 ^a	359 ± 31 ^b	180 ± 35 ^c	418 ± 57 ^d	19.8 ± 3.5 ^e

a, b, c, d, e 同一上标字母的数值之间比较无显著差异, $P>0.05$ (χ^2 检验)。

表 2 成熟重组卵母细胞的细胞遗传学分析

GV-胞质体复合体类型	检测卵数	染色体数(%)			含染色单体分离的卵母细胞数(%)
		18	19	20	
6W GV-6W 胞质体	54	0 (0)	5 (9.3)	49 (90.7) ^a	4 (7.4) ^c
6W GV-9M 胞质体	29	3 (10.3)	3 (10.3)	23 (79.3) ^a	2 (6.9) ^c
9M GV-6W 胞质体	29	1 (3.4)	5 (17.2)	23 (79.3) ^a	7 (24.1)
6W GV-12M 胞质体	34	2 (5.9)	4 (11.7)	28 (82.4) ^a	3 (8.8) ^c
12M GV-6W 胞质体	35	3 (8.6)	4 (11.4)	28 (80.0) ^a	8 (25.0)
6W 对照	55	3 (5.5)	3 (5.5)	49 (89.1) ^a	5 (9.1) ^c
9M 对照	38	3 (7.9)	4 (10.5)	31 (81.6) ^a	10 (26.3)
12M 对照	42	1 (2.4)	7 (16.7)	34 (81.0) ^a	16 (38.1) ^b

a, c 同一上标字母的数值之间比较无显著差异, $P>0.05$; ^{b>c} $P<0.01$ (χ^2 检验)。

体分离的比率分别是 7.4%、6.9% 和 8.8%, 这与 6~8 周龄对照组(9.1%)比较无差异($P>0.05$), 但显著低于 12 月龄对照组(38.1%, $P<0.01$)。9M GV-6W 胞质体和 12M GV-6W 胞质体 2 组重组卵母细胞含染色单体分离的比率亦非常高(分别为 24.1% 和 25.0%), 尽管与 6~8 周龄和 12 月龄 2 个对照组比较差异不显著。

3 讨论

本研究中, 由年轻与老龄小鼠之间 GV 互换所重组的 5 组 GV-胞质体复合体的融合率为 89.7%~94.3%, 它们最终的体外成熟率为 84.7%~88.2%, 与对照组的体外成熟率相似。这些结果表明, 卵母细胞融合率和随后的成熟率并不因母源性衰老或来自不同年龄小鼠的 GV 或胞质体的改变而受到影响。

在哺乳动物, 精子通过启动细胞内的 Ca^{2+} 多次持续波动而将 MII 卵母细胞从中期阻断中释放出来^[15]。小鼠卵母细胞的钙振荡亦可由 Sr^{2+} 诱导产生^[12]。本研究中当用 20 mmol/L $SrCl_2$ 处理时, 成熟后的 5 组重组卵母细胞在 Ca^{2+} 幅值、持续时间及间隔时间都呈现与对照卵母细胞相似的钙振荡模式, 表明无论是显微操作还是小鼠的衰老都没有改变 Sr^{2+} 诱导的卵母细胞钙振荡的能力。

我们的结果表明昆明白小鼠呈现与衰老相关的卵母细胞减数分裂异常, 其证据是在 9 月龄和 12 月龄小鼠的卵母细胞观察到染色单体的提早分离明显增加。Eichenlaub-Ritter^[16]和 Pellestor^[3]也分别在小鼠和人卵母细胞报道了与衰老相关的染色单体提早分离比率的增加, 并认为这些染色单体是在第一次减数分裂时由于提前分离而产生的。我们这里的细胞遗传学分析表明, 与对照卵母细胞比较, 年轻小鼠之间的 GV 移植在体外成熟后并未增加染色单体提早分离的发生。因此, 由 GV 移植重组的卵母细胞可作为一适当的细胞模型, 用来研究细胞质与细胞核因素对正常减数分裂的相关作用。由于可以在不同质量或年龄的卵母细胞之间进行 GV 互换, GV 移植对确定引起老龄动物卵母细胞减数分裂异常增加的细胞内因子和 / 或机制是十分有用的。

Tarín^[17]认为由于线粒体功能受损及由此导致的氧化应激增加, 老龄妇女卵母细胞的细胞质不能调节正常减数分裂。Battagli 等^[18]观察到由衰老卵母细胞的细胞质微管构建正常减数分裂纺锤体的异常。应用 GV 移植技术, 当老龄妇女卵母细胞的 GV 移入到年轻妇女去核的未成熟卵母细胞里时, 在 4/5 个^[5]、

2/2 个^[6]或 5/7 个^[19]重组卵母细胞观察到了正常的第二次减数分裂中期染色体。相反, 3 个在老龄妇女卵母细胞质成熟的年轻个体 GV 有 2 个显示异常核型^[19]。这些发现似乎支持这样的假说: 在完成第一次减数分裂期间, 细胞质因子主要负责双价染色体的平衡分离。然而, 由于进行核移植的人卵母细胞的稀缺以及数据十分有限, 还不可能得到确切的结论。

我们在小鼠所得到的结果与上述人的相反。当年轻小鼠(6~8 周龄)卵母细胞的 GV 移入老龄小鼠(9 月龄和 12 月龄)的卵细胞质中时, 呈染色单体提早分离的卵母细胞的比率 (6W GV-9M 胞质体: 6.9%; 6W GV-12M 胞质体: 8.8%)与年轻对照小鼠(9.1%)的相似, 但显著低于 12 月龄对照组(38.1%)。相反, 当由老龄小鼠 GV 和年轻小鼠胞质体重组卵母细胞时, 含染色单体提早分离的比率 (9M GV-6W 胞质体: 24.1%; 12M GV-6W 胞质体: 25.0%)比年轻对照小鼠增加 2~3 倍。我们的结果表明, 在小鼠, 年轻卵细胞质不能纠正老龄 GV 的减数分裂错误, 相反, 老龄卵细胞质也不趋于诱导年轻小鼠减数分裂染色体的异常分离。我们先前对重组卵母细胞染色体排列及纺锤体构象的免疫组化研究结果亦表明将 GV 移入到年轻小鼠的卵细胞质中不能够拯救老龄小鼠卵母细胞与衰老相关的减数分裂染色体错排^[20]。因此, 我们认为除卵细胞质因素外, 染色体本身以及细胞核因素在减数分裂异常的发生上具有主要的作用。

参考文献 (References)

- [1] Tarlatzis BC *et al.* *Ann N Y Acad Sci*, 2003, **997**: 93
- [2] Plachot M. *Placenta*, 2003, **24 Suppl B**: s66
- [3] Pellestor F. *Med Sci (Paris)*, 2004, **20**: 691
- [4] Warburton D. *Cytogenet Genome Res*, 2005, **111**: 266
- [5] Zhang J *et al.* *Fertil Steril*, 1999, **71**: 726
- [6] Takeuchi T *et al.* *Hum Reprod*, 2001, **16**: 730
- [7] Liu L *et al.* *Biol Reprod*, 2004, **71**: 1724
- [8] Moffa F *et al.* *Hum Reprod*, 2002, **17**: 178
- [9] Takeuchi T *et al.* *Hum Reprod*, 2004, **19**: 975
- [10] Gryniewicz G *et al.* *J Boil Chem*, 1985, **260**: 3440
- [11] Poenie M *et al.* *Nature*, 1985, **315**: 147
- [12] Zhang D *et al.* *Hum Reprod*, 2005, **20**: 3053
- [13] Dyban AP *et al.* *Stain Technol*, 1983, **58**: 69
- [14] Rybouchkin A *et al.* *Hum Reprod*, 1996, **11**: 2170
- [15] Halet G *et al.* *Biochem Soc Trans*, 2003, **31**: 907
- [16] Eichenlaub-Ritter U. *Maturitas*, 1998, **30**: 143
- [17] Tarín JJ. *Hum Reprod*, 1995, **10**: 1563
- [18] Battaglia DE *et al.* *Hum Reprod*, 1996, **11**: 2217
- [19] Palermo GD *et al.* *Hum Reprod*, 2002, **17**: 2165
- [20] Cui LB *et al.* *Hum Reprod*, 2005, **20**: 1624

Germinal Vesicle Transfer between Young and Aged Mouse Immature Oocytes

Long-Bo Cui*, Xue-Ying Zhou, Xiu-Ying Huang¹, Fang-Zhen Sun¹

(Department of Biology, Yantai University, Yantai 264005, China; ¹Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract To elucidate effects of nucleus or cytoplasm from different age of animals on oocyte maturation, Ca²⁺ oscillations and karyotypic status, germinal vesicles were exchanged between immature oocytes from mice of 6–8 weeks (6W), 9 months (9M) and 12 months (12M). Five groups of reconstructed oocytes were obtained by micromanipulation and electrofusion. Oocytes in five experiment groups and three control groups showed a similar pattern of Ca²⁺ oscillations by Sr²⁺ induction. The rates of the matured oocytes with premature chromatid separation for group 6W GV-6W cytoplasm, group 6W GV-9M cytoplasm and group 6W GV-12M cytoplasm were comparable to those of control 6–8 weeks ($P>0.05$), but significantly lower than those of control 12 months ($P<0.01$). However, the rates of the matured oocytes with premature chromatid separation increased for group 9M GV-6W cytoplasm and group 12M GV-6W cytoplasm. These findings demonstrate that oocytes reconstructed by GV exchange between young and aged mice show normal maturation and Ca²⁺ oscillation. It seems that the aged-related meiotic anomalies may be due to nucleus or chromosomes rather than cytoplasm.

Key words age; oocyte; germinal vesicle transfer; Ca²⁺ oscillation; chromosome

Received: August 1, 2006 Accepted: November 17, 2006

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

*Corresponding author. Tel: 86-535-6903162, Fax: 86-535-6902063, E-mail: lbcui@163.com