

# 低温对小鼠卵母细胞纺锤体损伤和发育潜力的影响

张军超\* 叶荣\* 鲍柳君 张焕相 朱子玉\*

(苏州大学医学部基础医学与生物科学学院, 苏州 215123)

**摘要** 为了评价低温对小鼠卵母细胞纺锤体损伤和发育潜力的影响以及损伤的可逆性, MII 期卵母细胞在 24 °C 室温或 4 °C 环境下分别处理 1、2、4 或 24 h, 并于 37 °C 下恢复培养 1 或 2 h, 复温或未经复温的卵孤雌激活后分析早期发育潜力, 并对处理的卵通过免疫荧光细胞化学技术检测纺锤体的损伤和重建动态。结果显示纺锤体受低温打击的受损程度明显依赖于处理温度和时间, 低温处理对纺锤体的损伤具有较强的可逆性, 不论 24 °C 或 4 °C, 处理时间不超过 4 h 的卵均能重建正常的纺锤体构像, 但孤雌激活胚胎的早期发育潜力仍然受到明显的影响, 而 24 h 低温处理导致了纺锤体构像的不可逆破坏。对不同卵龄小鼠卵母细胞的研究发现卵龄大小不影响低温打击后的卵发育潜力。这些结果提示在以卵母细胞为材料的细胞工程技术的操作过程中应尽可能缩短室温操作时间。

**关键词** 小鼠; 卵母细胞; 低温; 纺锤体; 孤雌激活

以体外受精(IVF)和胞质内精子注射(ICSI)为主的人类辅助生殖技术已经为数百万不育家庭带来了福音, 目前的成功率大约在 30%~40%。动物体细胞克隆的研究也取得了广泛的成功, 其在医学、畜牧业等多个领域的潜在应用受到高度关注, 但至今克隆效率一般仅 3%~5%。这些细胞工程技术不可避免地要在体外进行操作, 在低于体温的情况下, 温度就可能成为制约成功率的因素。

纺锤体在真核细胞的有丝分裂和减数分裂过程中起关键作用<sup>[1,2]</sup>, 它是出现于分裂期的一种暂时的动态微管结构, 常处于组装和去组装的动态变化过程中。这种不稳定性导致纺锤体容易受到各种因素的破坏, 进而可能影响减数分裂的进程和随后的胚胎发育<sup>[2-9]</sup>。

微管组装对于温度高度敏感。当低于一定温度时, 微管结构趋向解聚, 0~4 °C 时就会完全解聚。有报道显示, 室温(24 °C)或 4 °C 冷藏能造成牛、猪和人成熟卵母细胞的纺锤体结构和功能的损伤, 并影响随后的胚胎发育<sup>[3-8]</sup>。当经过低温处理的卵再次培养于 37 °C 后, 有些物种的卵母细胞纺锤体会重新恢复, 例如小鼠<sup>[3]</sup>, 而人<sup>[3,7]</sup>、牛<sup>[6]</sup>或羊<sup>[4]</sup>卵母细胞的纺锤体在经历了低温后只能有限恢复。但是低温对卵母细胞纺锤体损伤是否可逆还缺乏可信的研究结果, 而目前开展的辅助生殖技术及克隆技术需要对卵母细胞经历较长时间的室温操作, 因此我们以小鼠卵母细胞为材料, 研究低温处理对纺锤体动态和卵发育潜力的

影响, 以及卵母细胞受低温打击的可逆性。

## 1 材料与方法

### 1.1 小鼠超排与卵母细胞的收集

6~8 周龄的昆明白雌鼠(购自苏州大学实验动物中心)腹腔注射 10 IU PMSG, 间隔 48 h 注射 10 IU hCG。注射 hCG 后 13~18 h, 将小鼠颈椎脱臼处死, 取输卵管, 在 HCZB (Hepes-CZB)操作液中划开壶腹部, 收集卵丘卵母细胞复合体(cumulus oocyte complexes, COCs)。COCs 在含 300 IU 透明质酸酶(Sigma)的 HCZB 中处理, 将消化去卵丘细胞的 MII 卵母细胞洗涤后备用。

### 1.2 实验分组与处理

第一部分取 13~14 h 卵龄的 MII 期卵母细胞移入 CZB 培养液中(24 °C 或 4 °C 中预平衡 30 min), 分别在 24 °C 和 4 °C 低温处理 1、2、4 和 24 h, 然后孤雌激活培养。第二部分将 13~14 h 卵龄低温处理的卵母细胞移入 37 °C 培养箱中恢复培养 1 或 2 h, 再激活培养。第三部分取 17~18 h 卵龄的卵母细胞移入 CZB 培养液中分别在 24 °C 和 4 °C 低温处理 1、2、4 和 24 h, 然后激活培养。各组处理的卵母细胞都取部分进行免疫荧光染色。未处理的 MII 卵母细胞为

收稿日期: 2009-02-04 接受日期: 2009-05-14

苏州大学医学发展基金资助项目(No.EE120603)

\* 共同第一作者

\* 通讯作者。Tel: 0512-65880276, E-mail: zzy64@sina.com

对照。

### 1.3 孤雌活化

在无  $\text{Ca}^{2+}$  的 CZB 培养液中现加  $\text{SrCl}_2$ , 使其终浓度为 10 mmol/L, 并添加终浓度为 20  $\mu\text{mol/L}$  的细胞松弛素 B 以抑制极体排放。活化液平衡后加入对照组 MII 卵母细胞或各处理组卵母细胞, 覆盖石蜡油后于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、饱和湿度下培养 4 h, 洗涤后继续用 CZB 培养液培养。激活 6 h 后在相差显微镜下观察, 以见原核为激活的标志。

### 1.4 免疫荧光化学与显微观察

卵母细胞在 3.7% 多聚甲醛中室温固定 40 min。固定的卵母细胞在含有 0.1% Triton X-100 和 0.3% BSA 的 PBS 中 37  $^{\circ}\text{C}$  温育 30~40 min 作打孔处理, 用含 0.01% Triton X-100 的 PBS 清洗 3 次后, 移入含 150 mmol/L 甘氨酸和 0.3% BSA 的 PBS 中, 室温下温育 2 h 作封闭处理。样品与 1:100 稀释的 FITC 标记的抗  $\beta$  管蛋白抗体(monoclonal anti- $\beta$ -tubulin-FITC, Sigma) 共同温育, 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜。清洗液洗涤 3 次, 每次 5 min, 最后与 10  $\mu\text{g/ml}$  碘化丙锭(PI)温育 10 min, 进行核酸荧光染色。在洁净的载玻片上加一滴防荧光淬灭剂(DABCO, Sigma), 将处理好的卵转移其中, 封片后置于暗盒, 低温保存, 尽快用激光共聚焦显微镜(confocal laser microscope)观察, 取图, 并统计各种纺锤体构像的比例。图像用 Photoshop-CS 处理。

### 1.5 统计方法

实验重复 3 次以上, 所获数据用 SPSS 卡方检验作差异显著性分析。

## 2 结果

### 2.1 低温处理卵母细胞纺锤体损伤程度的观察

13~14 h 卵龄的小鼠 MII 期卵母细胞经过低温处理, 其纺锤体构像受到明显损伤(表 1)。正常的 MII 期

卵母细胞纺锤体位于卵皮层, 具有双极桶状构像, 凝集的染色体整齐地排列在中期板上(图 1A)。24  $^{\circ}\text{C}$  室温处理 1 h, 微管出现部分解聚, 仅 22.9% 的卵纺锤体构像正常, 多数纺锤体的异常导致染色体不能完全排列在中期板上(表 1、图 1B、图 1C)。处理 2~4 h 导致更多的卵纺锤体失去正常构像, 甚至完全解聚, 或仅有少量微管聚集在染色体周围(图 1D)。处理 24 h, 所有卵纺锤体完全解聚, 失去纺锤体束缚的染色体排列较松散(图 1E)。4  $^{\circ}\text{C}$  冷藏处理 1 h 以上所有卵纺锤体完全解聚, 对纺锤体构像的影响快速而彻底(表 1、图 1F、图 1G)。这些结果表明纺锤体的正确构像对低温的影响非常敏感, 而且纺锤体受低温打击的受损程度与处理温度和时间存在明显的依赖性。

### 2.2 低温处理后纺锤体损伤的可逆性

13~14 h 卵龄的卵母细胞经过 24 或 4  $^{\circ}\text{C}$  低温处理不同时间后, 再移入 37  $^{\circ}\text{C}$  环境中恢复培养 1 或 2 h。结果显示 24  $^{\circ}\text{C}$  室温处理 2 或 4 h 再复温后, 多数卵母细胞纺锤体恢复正常构像, 染色体恢复正常排列, 与复温前相比差异显著( $P < 0.05$ ), 而室温处理 24 h 后再复温的卵母细胞, 构像正常的纺锤体重建几乎没有发生(表 2、图 1H~图 1J)。4  $^{\circ}\text{C}$  冷藏 1、2 或 4 h 的卵母细胞复温后也发生纺锤体重建, 具有正常纺锤体构像的比例明显高于复温前( $P < 0.05$ ), 且复温 2 h 的效果明显好于 1 h, 但 4  $^{\circ}\text{C}$  处理 24 h 的卵复温后未见纺锤体重建, 染色体排列松散(表 2、图 1K、图 1L)。这些结果说明低温处理对纺锤体的损伤具有较强的可逆性, 但不论 24 或 4  $^{\circ}\text{C}$ , 长时间低温打击可能导致纺锤体结构和功能的不可逆破坏。

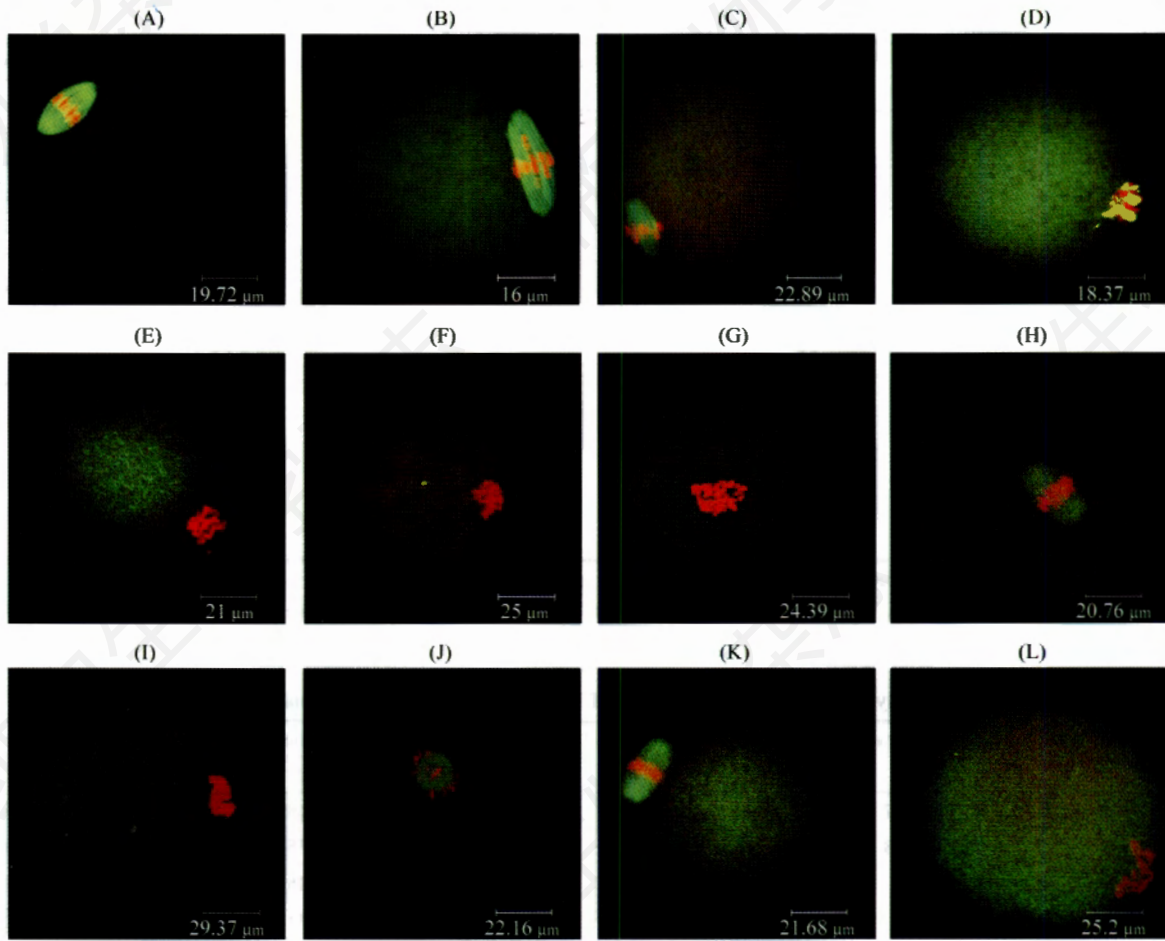
### 2.3 低温处理对孤雌激活卵发育潜力的影响

13~14 h 卵龄的 MII 卵母细胞 24 或 4  $^{\circ}\text{C}$  低温处理不同时间后孤雌激活, 结果发现 24  $^{\circ}\text{C}$  处理 1 或 2 h 的卵激活率和 2-细胞率没有明显影响( $P > 0.05$ ), 但

Table 1 Effect of cooling on the spindle configuration of MII mouse oocytes

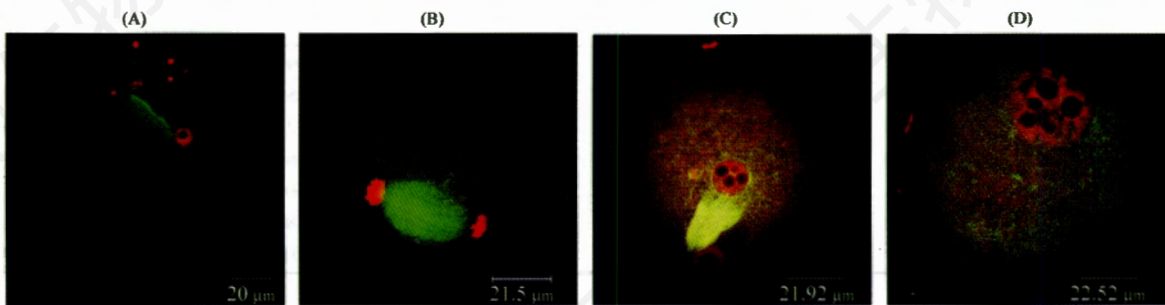
Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )	Time (h)	Total oocytes	Survival oocytes	Number (%) of oocytes with spindle configuration		
				Normal	Abnormal	None
Control	0	62	62	49 (79.0)	9 (14.5)	4 (6.5)
	1	35	35	8 (22.9)	17 (48.6)	10 (28.6)
	2	28	27	2 (7.4)*	16 (59.3)	9 (33.3)
24	4	46	41	6 (14.6)*	17 (41.5)	18 (43.9)
	24	49	31	0 (0.0)*	0 (0.0)	31 (100.0)
	1	30	30	0 (0.0)*	0 (0.0)	30 (100.0)
4	2	40	40	0 (0.0)*	0 (0.0)	40 (100.0)
	24	27	27	0 (0.0)*	0 (0.0)	27 (100.0)

The percentage of different spindle configuration compared with survival oocytes. The label \* indicates significant difference compared with control ( $P < 0.05$ ).



**Fig.1 The confocal micrographs of MII mouse oocytes during cooling and rewarming (green: microtubules; red: chromatin)**

A: control, the oocyte shows a normal meiotic spindle conformation; B–C: oocytes cooled at 24 °C for 1 h show abnormal spindle organization and chromosomes distribution; D: oocyte cooled for 2 or 4 h shows disassembled spindles or a little microtubules around the chromosomes; E: oocyte cooled for 24 h shows completely disassembled spindle and slightly dispersed chromosomes; F: oocyte cooled at 4 °C for 1, 2 or 4 h shows no assembled microtubules around chromosomes; G: oocyte cooled at 4 °C for 24 h accompanied with the loose chromosomes without spindle to tie; H: oocyte cooled at 24 °C for 2 or 4 h and then rewarmed for 1 or 2 h recovers normal spindle conformation and chromosome arrangement; I–J: oocytes cooled at 24 °C for 24 h and then rewarmed have almost no normal spindle reconstruction; K: oocyte cooled at 4 °C for 1, 2 or 4 h and then rewarmed for 1 or 2 h recovers normal spindle conformation; L: oocyte cooled at 4 °C for 24 h and then rewarmed has no spindle reconstruction.



**Fig.2 The confocal micrographs of parthenogenetic embryos derived from MII mouse oocytes cooled at 4 °C (green: microtubules; red: chromatin)**

A: control, the oocyte enters telophase 4 h after activating; B–C: the oocytes cooled at 4 °C for 1, 2 or 4 h also enter telophase and form two pronuclei 4–5 h after activating; D: the oocyte cooled at 4 °C for 24 h shows single pronucleus-like structure 5 h after activating, although without spindle.

**Table 2 Reestablishment of spindle of MII mouse oocytes after cooling-rewarming**

Cooling (°C/h)	Rewarmtime (h)	Total oocytes	Survival oocytes	Number (%) of oocytes with spindle conformation		
				Normal	Abnormal	None
24/2	1	48	48	27 (56.3)*	7 (14.6)	14 (29.2)
	2	34	34	28 (82.4)*,#	4 (11.8)	2 (5.9)
24/4	1	37	30	19 (63.3)*	3 (10.0)	8 (26.7)
	2	29	28	17 (60.7)*	4 (14.3)	7 (25.0)
24/24	1	59	26	4 (15.4)*	6 (23.1)	16 (61.5)
	2	82	32	1 (3.1)#	4 (12.5)	27 (84.4)
4/1	1	38	32	24 (75.0)*	6 (18.8)	2 (6.3)
	2	38	35	27 (77.1)*	2 (5.7)	6 (17.1)
4/2	1	33	32	12 (37.5)*	2 (6.3)	18 (56.3)
	2	25	25	17 (68.0)*,#	4 (16.0)	4 (16.0)
4/4	1	48	34	10 (29.4)*	8 (23.5)	16 (47.1)
	2	35	34	23 (67.6)*,#	1 (2.9)	10 (29.4)
4/24	1	30	24	0 (0.0)	0 (0.0)	24 (100.0)
	2	47	38	0 (0.0)	0 (0.0)	38 (100.0)

The percentage of different spindle conformation compared with survival. The label \* indicates significant difference ( $P<0.05$ ) between before (Table 1) and after rewarming. The label # indicates significant difference ( $P<0.05$ ) between rewarming for 2 h and 1 h.

**Table 3 The early developmental potential of MII mouse oocytes after cooling and activating**

Temperature (°C)	Time (h)	Total oocytes	Survival oocytes*	Activated oocytes	Number (%) of parthenogenetic embryos to		
					2-cell	4-cell	Mol-Bla
Control	0	157	141 (89.8)	135 (95.7)	125 (88.7)	74 (52.5)	43 (30.5)
	1	118	104 (88.1)	90 (86.5)	78 (75.0)*	37 (35.6)*	17 (16.3)*
	2	81	69 (85.2)	62 (89.9)	59 (85.5)	22 (31.9)*	12 (17.4)*
24	4	91	78 (85.7)	59 (75.6)*	56 (71.8)*	21 (26.9)*	12 (15.4)*
	24	66	33 (50.0)*	29 (87.9)	23 (69.7)*	10 (30.3)*	1 (3.0)*
	1	116	100 (86.2)	87 (87.0)	79 (79.0)*	34 (34.0)*	15 (15.0)*
4	2	121	112 (92.6)	75 (67.0)*	52 (46.4)*	25 (22.3)*	11 (9.8)*
	4	75	71 (94.7)	48 (67.6)*	33 (46.5)*	12 (16.9)*	7 (9.9)*
	24	72	71 (98.6)	9 (12.7)*	4 (5.6)*	0 (0.0)*	0 (0.0)*

The oocytes with shrunken, fragment or distorted were thought died during cooling or activating. The label \* indicates significant difference compared with control ( $P<0.05$ ).

**Table 4 The early development of cooled MII mouse oocytes after rewarming for 1 h and activating**

Temperature (°C)	Time (h)	Total oocytes	Survival oocytes	Activated oocytes	Number (%) of parthenogenetic embryo to		
					2-cell	4-cell	Mol-Bla
24	2	117	103 (88.0)	98 (95.1)	82 (79.6)	45 (43.7)	19 (18.4)
	4	104	74 (71.2)	66 (89.2)	63 (85.1)	28 (37.8)	16 (21.6)
	24	125	47 (37.6)	29 (61.7)	20 (42.6)	7 (14.9)	0 (0.0)
4	1	100	73 (73.0)	66 (90.4)	56 (76.7)	28 (38.4)	15 (20.5)
	2	67	41 (61.2)	34 (82.9)	29 (70.7)	10 (24.4)	5 (12.2)
	4	102	62 (60.8)	46 (74.2)	36 (58.1)	12 (19.4)	7 (11.3)
	24	83	66 (79.5)	7 (10.6)	2 (3.0)	1 (1.5)	0 (0.0)

4-细胞率和桑-囊胚率明显低于 MII 卵母细胞直接激活的对照组 ( $P<0.05$ ), 而 24 °C 处理 4 或 24 h 后的孤雌激活卵无论是激活率还是各期的发育率都显著低于对照 ( $P<0.05$ ) (表 3)。4 °C 冷藏处理 1 h 也不影响

激活率和 2-细胞率, 但 4-细胞之后的发育率显著降低 ( $P<0.05$ ), 而处理超过 2 h 则导致激活率和各期发育率均明显低于对照 ( $P<0.05$ ) (表 3)。

孤雌激活期间的免疫荧光染色显示 4 °C 处理 1~4 h

**Table 5** The early development of 17~18 h oocyte's age of MII mouse oocytes after cooling

Temperature (°C)	Time (h)	Total oocytes	Survival oocytes	Activated oocytes	Number (%) of parthenogenetic embryo to		
					2-cell	4-cell	Mol-Bla
24	1	73	63 (86.3)	50 (79.4)	43 (68.3)	18 (28.6)	8 (12.7)
	2	88	74 (84.1)	63 (85.1)	59 (79.7)	21 (28.4)	10 (13.5)
	4	66	58 (87.9)	51 (87.9)	45 (77.6)	15 (25.9)	6 (10.3)
	24	85	38 (44.7)	33 (86.8)	26 (68.4)	13 (34.2)	4 (10.5)
4	1	100	78 (78.0)	62 (79.5)	59 (75.6)	22 (28.2)	9 (11.5)
	2	87	78 (89.7)	55 (70.5)	38 (48.7)	22 (28.2)	7 (9.0)
	4	69	63 (91.3)	39 (61.9)	29 (46.0)	12 (19.0)	7 (11.1)
	24	73	66 (90.4)	4 (6.1)	3 (4.5)	0 (0.0)	0 (0.0)

的卵虽然纺锤体已完全解聚(图 1F), 但激活后的孤雌胚减数分裂进程没有推迟, 与对照相似, 激活 4~5 h 可见末期样纺锤体结构, 形成 2 个原核(图 2A~图 2C)。而处理 24 h 的卵激活后形成 1 个原核(图 2D)。

对低温处理后的卵母细胞在 37 °C 恢复 1 或 2 h 再进行孤雌激活, 结果显示与低温处理后直接激活相比, 复温 1 h 并不能明显改善激活率或早期发育潜力(表 4), 复温 2 h 也呈类似结果(数据未显示)。

这些结果表明卵母细胞的激活和孤雌胚的发育潜力与低温处理强度存在一定的相关性, 但不管处理温度高低或时间长短, 低温对纺锤体的损伤可能直接抑制了胚胎跨越 2-细胞阻滞和之后的进一步发育。

#### 2.4 卵龄对低温处理的卵母细胞发育潜力的影响

我们进一步研究了注射 hCG 17~18 h 后收集的 MII 卵母细胞, 对其低温处理后再孤雌激活。结果发现不管处理的温度和时间, 17~18 h 卵龄的卵母细胞孤雌激活率和早期胚胎的各期发育率与 13~14 h 卵龄相比均无显著差异( $P>0.05$ ) (表 5), 表明低温对卵母细胞的影响与卵龄大小无关。

### 3 讨论

真核细胞分裂期间, 由微管组装的纺锤体是控制染色体排列、分离和完成核分裂的关键结构。微管组装对于温度高度敏感, 减数分裂纺锤体的正常构像也受温度的影响。有报道显示, 成熟的牛、猪和人卵母细胞减数分裂纺锤体在低温下迅速解聚<sup>[10]</sup>, 尤其是人卵母细胞在 25 °C 仅 10 min, 其纺锤体就出现不可逆的损伤<sup>[10]</sup>。我们的研究显示低温对小鼠 MII 期卵母细胞的纺锤体损伤存在明显的温度和时间依赖性, 其纺锤体在室温下 2~4 h 并没有完全解聚, 尽管这与 Pickering 等<sup>[9]</sup>报道的小鼠卵在 25 °C 下 1 h 纺锤体就完全解聚的结果不一致, 但我们的结果表明小鼠卵母细胞纺锤体对低温的敏感性低于非啮齿类哺乳

动物。

在动物克隆和人类辅助生殖技术中不可避免地要对卵母细胞进行体外操作, 一定时间的室温操作可能会因为微管的解聚造成纺锤体的损伤, 但是否会威胁胚胎发育取决于这种低温打击的可逆性。我们的研究发现不管是室温 24 °C 或是 4 °C 处理时间不超过 4 h 的情况下, 经过 37 °C 复温 1~2 h, 小鼠卵均能基本恢复正常的纺锤体构像, 表明低温对小鼠卵纺锤体损伤具有良好的可逆性。有报道显示低温处理的牛卵复温后明显恢复了正常的纺锤体构像<sup>[6]</sup>, 已有的以小鼠卵为材料的研究也表明 4 °C 短时间冷藏后 37 °C 复温可完全恢复其纺锤体重建<sup>[5]</sup>。但对人卵低温损伤的可逆性研究表明复温处理不能或很少可以重新形成正常纺锤体<sup>[10-12]</sup>。不过我们也发现, 24 或 4 °C 低温处理 24 h 后复温 2 h 也不能产生正常纺锤体的重建, 因此小鼠卵纺锤体低温损伤的可逆性与受损时间有关, 长时间低温处理导致了小鼠卵母细胞纺锤体的不可逆的破坏。

不同物种表现的纺锤体低温损伤可逆性的差异可能与不同的卵子中心体遗传模式有关。人卵缺乏中心体, 只有少量中心粒周基质可以被募集, 帮助复温时微管的重新组装和纺锤体的重建<sup>[6,12]</sup>。而小鼠卵母细胞虽然缺乏中心粒, 但胞质中存在大量的微管星体<sup>[13]</sup>, 正是这些胞质星体发挥了微管组织中心的作用, 促进了纺锤体的重建。而长时间的低温处理可能导致卵胞质微管星体的破坏, 也使胞质中的许多因子受到破坏或失活, 包括与纺锤体组装有关的因子如成熟促进因子(maturation promotion factor, MPF)和 MAPK<sup>[14,15]</sup>, 从而导致纺锤体重建的失败。

低温处理不超过 4 h 的小鼠卵孤雌激活后减数分裂进程没有推迟, 但激活率和早期胚胎的发育潜力明显降低。表明激活期间 37 °C 的培养温度保证了以胞质星体为核心的快速的纺锤体重建, 且并不依赖于

额外的复温过程。即使复温处理也并不能改善激活率和孤雌胚的早期发育潜力。4℃冷藏的卵激活后4~5 h与对照一样进入末期,但是形成单个大的原核样结构,这是由于长时间低温处理导致了纺锤体的不可逆损伤,纺锤体重建的失败导致后期染色体不能分离,因此进入末期时不能形成2个原核。

短时间低温处理的小鼠卵母细胞纺锤体受到不同程度的损伤,虽然表现出良好的可逆性,激活后能迅速恢复纺锤体重建,但仍然显示植入前发育的异常。即使有些组的激活率和2-细胞率与对照没有显著差异,但几乎所有组的4-细胞和桑-囊胚率都明显低于对照,包括激活前经过复温的处理组。我们推测激活或复温期间虽然重建了正常的纺锤体构像,但低温对卵胞质内一些重要物质的破坏没有完全恢复,而卵胞质的内外环境对其跨越2-细胞阻滞非常关键,因此低温处理抑制了胚胎跨越2-细胞阻滞和其随后的进一步发育。

老化的卵母细胞的发育进程会加快,并且容易产生多精受精和染色体非整倍性<sup>[16,17]</sup>。但是我们的实验显示,17~18 h卵龄老化的小鼠卵母细胞低温处理后的发育潜力与13~14 h卵龄的卵没有显著差异,说明卵龄大小并不影响低温打击后的卵发育潜力,但染色体倍性是否存在差异还需进一步研究。

综上所述,我们的研究揭示了不超过4 h的室温操作甚至冷藏对卵母细胞纺锤体的损伤具有较强的可逆性,但由于卵胞质关键组分的破坏导致发育潜力仍然受到明显的影响,因此室温操作时间的延长可能会对动物克隆或人类辅助生殖等技术成功率带来不利影响。这些结果提示我们在以卵母细胞为材料的细胞工程技术的操作过程中应尽可能缩短室温操作时间。

### 参考文献(References)

- [1] Pickering SJ, Johnson MH, Braude PR. Cytoskeletal organization in fresh, aged and spontaneously activated human oocytes, *Hum Reprod*, 1988, 3(8): 978-989
- [2] Wang WH, Meng L, Hackett RJ, et al. The spindle observation and its relationship with fertilization after intracytoplasmic sperm injection in living human oocytes, *Fertil Steril*, 2001, 75(2): 348-353
- [3] Magistrini M, Szöllösi D. Effects of cold and isopropyl-N-phenylcarbamate on the second meiotic spindle of mouse oocytes, *Euro J Cell Biol*, 1980, 22(2): 699-707
- [4] Moor RM, Crosby IM. Temperature-induced abnormalities in sheep oocytes during maturation, *J Reprod Fertil*, 1985, 75(2): 467-473
- [5] Pickering SJ, Johnson MH. The influence of cooling on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocytes, *Hum Reprod*, 1987, 2(3): 207-216
- [6] Aman RR, Parks JE. Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of *in vitro*-matured bovine oocytes, *Biol Reprod*, 1994, 50(1): 103-110
- [7] Almeida PA, Bolton VN. The effect of temperature fluctuations on the cytoskeletal organization and chromosomal constitution of the human oocyte, *Zygote*, 1995, 3(4): 357-365
- [8] Liu RH, Sun QY, Li YH, et al. Effects of cooling on meiotic spindle structure and chromosome alignment within *in vitro*-matured porcine oocytes, *Mol Reprod Dev*, 2003, 65(2): 212-218
- [9] Hochwagen A, Wrobel G, Cartron M, et al. Novel response to microtubule perturbation in meiosis, *Mol Cell Biol*, 2005, 25(11): 4767-4781
- [10] Combelles CM, Cekleniak NA, Racowsky C, et al. Assessment of nuclear and cytoplasmic maturation in *in vitro* matured human oocytes, *Hum Reprod*, 2002, 17(4): 1006-1016
- [11] Wang WH, Meng L, Hackett RJ, et al. Limited recovery of meiotic spindles in living human oocytes after cooling-rewarming observed using polarized light microscopy, *Hum Reprod*, 2001, 16(11): 2374-2378
- [12] Pickering SJ, Braude PR, Johnson MH, et al. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte, *Fertil Steril*, 1990, 54(1): 102-108
- [13] Messinger SM, Albertini DF. Centrosome and microtubule dynamics during meiotic progression in the mouse oocyte, *J Cell Sci*, 1991, 100(Pt2): 289-298
- [14] Downs SM. Factors affecting the resumption of meiotic maturation in mammalian oocytes, *Theriogenology*, 1993, 39(1): 65-79
- [15] Eppig JJ, Schultz RM, O'Brien M, et al. Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes, *Dev Biol*, 1994, 164(1): 1-9
- [16] Ishikawa H, Omoe K, Endo A. Growth and differentiation schedule of mouse embryos obtained from delayed matings, *Teratology*, 1992, 45(6): 655-659
- [17] Santalo J, Badenas J, Calafell JM. The genetic risks of *in vitro* fertilization techniques: the use of an animal model, *J Assist Reprod Genet*, 1992, 9(5): 462-474

## Effects of Cooling and Rewarming on the Meiotic Spindle and the Developmental Potential of the Mouse Oocytes

Jun-Chao Zhang<sup>#</sup>, Rong Ye<sup>#</sup>, Liu-Jun Bao, Huan-Xiang Zhang, Zi-Yu Zhu\*

(School of Medicine and Life Science, Medical College of Soochow University, Suzhou 215123, China)

**Abstract** In order to evaluate the effects of cooling on the meiotic spindles, development potential of mouse oocytes and the reversibility of the spindle's damage, the Metaphase-II mouse oocytes were exposed at room temperature (24 °C) or 4 °C for 1, 2, 4 or 24 h and part of the oocytes renew by culturing at 37 °C for 1 or 2 h. The early developmental potential of these oocytes was analyzed by parthenogenetic activation and the dynamic of damage and reconstruction of the spindles was detected by confocal microscopy. The results displayed that the damage of the spindles after cooling relied obviously on the temperature and time of the treatment. The damage of spindles after low temperature treatment for less than 4 h, in spite of 24 or 4 °C, was strongly reversible, and the oocytes could reconstruct normal spindle configuration, but the early developmental potential of parthenogenetic embryos derived from these oocytes was evidently decreased. The different oocyte's age had no influence to the injury of the oocytes by cooling. The results suggest that the operative time of cell engineering procedure using oocytes should be shorten as much as possible.

**Key words** mouse; oocyte; cooling; spindle; parthenogenetic activation

Received: February 4, 2009 Accepted: May 14, 2009

This work is supported by the Medical Development Foundation of Soochow University (No.EE120603)

<sup>#</sup>Jun-Chao Zhang and Rong Ye contributed equally to this work

\*Corresponding author. Tel: 86-512-65880276, E-mail: zzy64@sina.com