

前孢子细胞分化的影响。此外,cAMP 与其受体作用后,影响其下游的什么物质也值得我们去进行深入的研究。

摘 要

本文综述了盘基网柄菌(*Dictyostelium discoideum*)发育过程中细胞类型的诱导和分化,细胞外 cAMP 及其四种位于细胞表面的受体及 PKA(蛋白激酶 A)、GSK-3(糖原合成酶激酶)和 STATa 等在网柄菌发育过程中的作用。

参 考 文 献

[1] Aubry L. et al., 1999, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 15:

469-517.

[2] Caccarelli A. et al., 1999, *Cell*, 65: 983-989.

[3] Abe T. 1994, *Cell*, 77: 687-699.

[4] Jason M. et al., 1999, *Dev. Biol.*, 216: 426-441.

[5] Abe K. et al., 1983, *Dev. Biol.*, 95: 200-210.

[6] Araki T. et al., 1998, *EMBO J.*, 17: 4018-4028.

[7] Harwood A.J. et al., 1993, *Dev.*, 118: 1041-1048.

[8] Dona R. 1998, In the Principles of Cell Adhesion, CRC Press.

[9] Fosnaugh K. L. et al., 1991, *Dev. Genet.*, 12: 123-132.

[10] Berks M. et al., 1990, *Dev.*, 110: 977-984.

[11] Clay J.L. et al., 1995, *Dev.*, 12: 1525-1538.

[12] Araki Y. 1997, *Dev. Biol.*, 192: 645-648.

[13] Klein P.S. et al., 1988, *Sci.*, 241: 1467-1472.

[14] Saxe C.L. 1996, *Dev. Biol.*, 174: 202-213.

[15] Louis J.M. et al., 1994, *Genes Dev.*, 8: 2086-2096.

卵母细胞胞质内注射技术获得胚胎的研究现状

征曰良 仲跻锋 宋 杰

(山东师范大学生命科学学院 济南 250014 山东省农科院生物技术研究中心 济南 250100)

近年来,胚胎的体外生产技术发展迅速,人们把生殖细胞(如精子、精母细胞)或体细胞(如卵丘细胞、胎儿成纤维细胞)的核注入去核卵母细胞,均得到完全发育的后代。卵母细胞胞质内注射技术的发展,对受精过程和核质相互关系的研究,具有重要作用。

一、胞质内精子或精子头的注射

1. 卵母细胞种类和操作温度对注射效果的影响

Uehara 首次进行了仓鼠精子的显微注射实验,并得到发育较好的原核,但仓鼠的卵母细胞在体外难以培养,小鼠的卵和胚胎在体外易培养,但其精子显微注射很困难。小鼠卵母细胞质的黏度不及仓鼠,用注射针刺破小鼠卵膜,胞质会渗出,不久,卵母细胞退化,而用同样方法处理仓鼠的卵母细胞,胞质不会渗出,注射后的大多数卵母细胞仍旧存活。另外,小鼠卵膜的弹性比仓鼠的要大,用注射针刺仓鼠的卵母细胞时,透明带凹入,接着透明带和卵膜迅速被刺破,对小鼠来说,注射针容易刺破透明带,却难以刺破卵膜。当胞膜被刺破后,凹入的卵膜开始复原,破口逐渐愈合。这种复原能力受温度的影响,在温度高(25-37℃)时,复原较快,但卵母细胞易退化,这可能是由于卵膜复原到原始位置时,破口还未来得及愈合,周围的培养液进入卵母细胞的缘故。在温度低(17-18℃)时,卵质黏度增大,复原过程减

慢,破口有充足的时间进行愈合,阻止了培养液进入胞质^[1]。精子注射后,抽回注射针时,要避免针中的培养液流出,因为这会阻止凹入卵膜的复原。Kimura 等采用向注射针内施加适当负压的方法,来避免这种情况,效果较好^[1]。

2. 精子的制动或精子头的分离

若把活动的精子注入卵母细胞,精子会在胞质内运动一段时间,这可能破坏胞质结构和妨碍卵膜的愈合,因此,在注射前,常常对精子进行制动处理或分离出精子头。制动的办法是:把精子的尾部先吸入注射针,连续地吹吸;或当精子尾的中后段处于注射针中时,施加几个压力脉冲,使精子丧失运动能力。Kimura 等把制动后的精子注入卵母细胞,获得了后代小鼠^[1],而 Kuretake 等用小鼠的精子头进行注射,同样获得了成功^[2]。精子头的分离过程如下:用 Tris 缓冲液(50mmol/L, pH=7.7)制备精子悬浮液,超声处理 10 秒,进行蔗糖梯度离心,收集无尾的精子头,再在 2500×g 下离心洗涤三次,每次 10 分钟。把精子头以 10⁸ 个/ml 的密度悬浮于 Tris 缓冲液中,4℃ 下贮存,48 小时内使用,或分成小份于 -60℃ 下冷冻保存。分离精子头时,精子质膜被破坏,促使精子质膜在卵母细胞内降解,利于精子细胞器与卵质融为一体,从而提高受精率,但这也会使培养液中的大量 Na⁺ 和 Ca²⁺ 进入精子,引起核的迅速降解,进而导致精子死亡,而进入精子的大量 K⁺ 对核的破坏程度相对较小。

把精子核保存于含 K^+ 丰富但无冷冻保护剂的 NIM 培养液中,注射到卵母细胞后,受精效果好但受精卵的发育能力差,说明冷冻保护剂能保护精子 DNA 及其他成分免受冷冻伤害^[2]。

3. 精子核去凝聚

胞质内精子注射后,卵母细胞还原精子核二硫键而使精子核去凝聚,这种还原活性在成熟 MⅡ 卵母细胞中最大,受精后下降,在原核期受精卵中消失。在此过程中,卵母细胞内谷胱甘肽(GSH)水平的波动起着调节作用^[3]。谷胱甘肽能诱导精子核去凝聚,二巯胺能专一性地氧化谷胱甘肽(GSH),从而也抑制了显微注射后精子核的去凝聚。

Perreault 等把四种二硫键含量不同的仓鼠精子核:含大量二硫键的附睾尾精子核、中等含量二硫键的附睾头精子核、较少二硫键的精子细胞的核和用二硫键还原剂 DTT 处理过的附睾尾精子核分别注射进卵母细胞中,它们分别于注射后 45-60 分钟、10-20 分钟、5-10 分钟去凝聚,在显微注射后 1.5 小时,形成雄原核的比例分别是 5%、25%、50% 和 45%。因此,精子核的二硫键越少,去凝聚得越快,雄原核形成得也越迅速,但不管精子核去凝聚的快慢如何,雄原核不会在雌原核形成之前产生,但含极少二硫键的精子核变成雄原核的时间可能与雌原核形成的时间同步^[4]。

二、胞质内精母细胞核的注射

Sasagawa 等把小鼠初级精母细胞的核注入成熟的卵母细胞(Met-Ⅱ期),精母细胞的核形成 Met-Ⅰ期的结构,此时,卵母细胞含有母本的 Met-Ⅱ期染色体和父本的 Met-Ⅰ期染色体,激活后,每套染色体的一半进入极体,把来自父本的极体移入 Met-Ⅱ期卵母细胞,从而卵母细胞含有两套 Met-Ⅱ期染色体,激活后,形成两个原核和两个极体,合子开始发育。当 258 个 2-细胞期的胚胎被移植后,得到了 2 个完全发育的鼠仔,因此,在卵母细胞的胞质中,初级精母细胞的核能够完成两次连续的减数分裂,但胚胎的发育率极低,原因可能是:(1)初级精母细胞对人工操作极敏感,对核的极小损伤就会引起胚胎死亡;(2)用来操作精母细胞核的培养基 Hepes-CZB 并非最合适;(3)大多数粗线期精母细胞还未完成基因组印迹,父本和母本基因组的不同印迹对正常的胚胎发育是必须的,减数分裂前,99% 的 DNA 合成出现于前粗线期,DNA 的修复出现于粗线期,实验中的大部分初级精母细胞可能还未完成

DNA 的修复;(4)精子的显微注射过程省略了减数分裂中的一些关键事件,在卵母细胞中,尽管来自粗线期初级精母细胞的 Met-Ⅰ期染色体结构看上去正常,但由于粗线期时间大大缩短,染色体的交换和分开可能出现了一些错误;(5)显微注射过程中的一些技术问题也影响实验的结果^[5]。把初级精母细胞的核移入 Met-Ⅱ期卵母细胞后,在 Met-Ⅱ期的胞质环境中,精母细胞核却形成了 Met-Ⅰ期染色体和纺锤体结构,说明染色体和纺锤体的结构特征是由供体核而非宿主胞质决定的。精母细胞的核移入卵母细胞后,胞质发生不均等分裂,其一半染色体排到极体中,因此,卵母细胞胞质分裂的特征是由卵母细胞胞质而非核的来源决定的^[5]。

Kimura 等把次级精母细胞的核注入成熟的卵母细胞,精母细胞的染色体浓缩并排在中期纺锤体上,用电脉冲刺激后,两套染色体恢复减数分裂,形成两个原核和两个极体,最后也产生了后代小鼠,因此,次级精母细胞的核也能在成熟的卵母细胞中完成第二次减数分裂^[6]。

三、胞质内体细胞核的注射

把 10-15 个成熟的卵母细胞放在含 $5\mu\text{g/ml}$ 细胞松弛素 B 的 Hepes-CBZ 液中,用固定针吸住卵母细胞,使第一极体位于 3 点钟位置处,用去核针吸出第一极体及其深面的少量胞质,其中含有 Met-Ⅱ染色体和纺锤体。利用注射针吸进并使直径为 $10-12\mu\text{m}$ 的卵丘细胞的细胞膜破裂,轻轻吹吸使细胞失去胞质,把游离的核注射进卵母细胞质中。注射后,把卵母细胞移入含 10mM Sr^{2+} 和 $5\mu\text{g/ml}$ 细胞松弛素 B、无 Ca^{2+} 的 CZB 液中, Sr^{2+} 能激活卵母细胞,细胞松弛素 B 抑制激活后极体的形成和染色体的排出。激活后,卵母细胞移至不含 Sr^{2+} 和细胞松弛素 B 的 CZB 液中, 37.5°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 下培养。把 2-8 细胞期胚胎或桑葚胚/囊胚移植进受体母鼠的输卵管或子宫角中^[7]。

Wakayama 等把成年小鼠的睾丸支持细胞、神经元细胞和卵丘细胞的核分别注射进去核的卵母细胞中,前二者通常不分裂,处于 G_0 期,均未得到完全发育的后代;90% 的卵丘细胞处于 G_0/G_1 期,来自卵丘细胞核注射的胚胎发育成活的小鼠,第一只出生的小鼠命名为 Cumulina,这是世界上第一只体细胞克隆小鼠。在该实验中,卵母细胞未与精子接触过,与受体母鼠交配的雄鼠的输精管已被结扎,后代小鼠的眼和皮毛的颜色与核供体小鼠的相同,所

有的核注射小鼠均是雌性,后代小鼠与核供体小鼠属于同一基因型,说明后代小鼠确实是来自卵丘细胞核注射的克隆动物^[7]。

卵丘细胞核注射后,卵母细胞放置0~6小时进行激活,发现核注射和卵母细胞激活的时间间隔影响卵母细胞的发育率。注射后立即激活、注射后1~3小时激活、注射后3~6小时激活,桑葚胚/囊胚的形成率分别是39.9%、58.4%、66.9%。Wakayama等(1998)认为:核注射后,把G₀期卵丘细胞核暴露于卵母细胞质的时间延长,会使核染色质长时间凝聚,促进了核的重新修饰,有利于胚胎发育^[7]。

目前,通过核移植生产克隆动物的方法有两种,即融合法和核注射法。Wilmut等把绵羊乳腺细胞与去核卵母细胞电融合,构成重组胚,用多个电脉冲来激活卵母细胞,最后获得了世界上第一只体细胞克隆羊Dolly^[8]。Wakayama等采用了后一种方法,克隆出小鼠Cumulina。Wakayama认为:使用核注射的方法,相对于电融合法来说,对卵母细胞和供体核的操作变得快速有效,减轻了对两者的损伤,而且进入卵母细胞内的体细胞胞质的数量较少,从而减少了体细胞胞质对重组胚发育的不利影响^[7]。

Onishi等把猪胎儿成纤维细胞的核注射到去核卵母细胞中,采用一个强电脉冲(1.5KV/cm, 100μs)激活卵母细胞,得到了克隆猪,命名为Xena,说明胞质内体细胞核注射的方法同样适用于大型动物的克隆^[9]。

研究工作

中脑神经前体细胞的体外分离、培养和特性

孙 秀 陈生弟 刘振国 刘卫国 梁 梁 徐洁懿

(上海第二医科大学瑞金医院神经内科 上海 200025)

最初人们认为神经前体细胞仅存在于发育中的脑组织,神经细胞发育成熟后则停止分化,神经系统丧失再生功能。目前发现神经前体细胞不仅存在于发育中的脑组织,也存在于成熟的脑组织内。其分布较为广泛,已证实成熟脑组织的室下区、纹状体、海马齿状回、下丘脑、脊髓等处存在神经细胞^[1-3]。长期以来体外培养神经前体细胞存在较大困难。为研究神经前体细胞的特性和了解神经前体细胞对外源性因子的反应,将逆转录病毒介导的癌基因myc

结 语

结构和功能上有缺陷的精子常常不能穿过透明带和卵膜,结果受精失败,在精子核正常的情况下,胞质内注射可解决这个问题,给不孕夫妇带来希望。通过核移植结合基因修饰的方法,来生产转基因克隆动物,使其制造人类所需要的蛋白质(如克隆牛乳腺制药)或供应排异性小的器官(如克隆猪的器官),进行异种移植,来替换人体受损或病变器官,应用前景十分广阔,在这方面,胞内体细胞核的注射提供了一种行之有效的方法。

摘 要

卵母细胞胞质内注射是体外生产胚胎的一种重要技术,本文对胞质内生殖细胞和体细胞核注射的研究状况进行了综述。

参 考 文 献

- [1] Kimura Y, et al., 1995, *Biol. Reprod.*, **52**:709-720.
- [2] Kuretake S, et al., 1996, *Biol. Reprod.*, **55**:789-795.
- [3] Perreault SD, et al., 1988, *Dev. Biol.*, **125**:181-186.
- [4] Perreault SD, et al., 1987, *Biol. Reprod.*, **36**:239-244.
- [5] Sasagawa I, et al., 1998, *Biol. Reprod.*, **58**:248-254.
- [6] Kimura Y, et al., 1995, *Biol. Reprod.*, **53**:855-862.
- [7] Wakayama T, et al., 1998, *Nature*, **394**:369-374.
- [8] Wilmut I, et al., 1997, *Nature*, **385**:810-813.
- [9] Onishi A, et al., 2000, *Science*, **289**:1188-1190.

或SV40大T抗原转入神经前体细胞建立了若干永生细胞系,如HiB5, RN33B和RN46A,以了解神经前体细胞体外增殖和分化的有关特性。但永生细胞

本文2001年11月28日收到,2002年5月18日接受。
基金项目:国家重点基础研究规划“脑功能和脑重大疾病的基础研究”;国家自然科学基金资助项目(G19999054008);国家自然科学基金资助项目(39970263);上海市卫生系统百名跨世纪优秀学科带头人培养计划(97BR001);上海二医大-上海生命科学中心科研项目。