

20min. These results indicated that the effects of extremely low frequency pulsed electrical field on liver cells have two aspects: 1). The extremely low frequency pulsed electrical field could affect insulin receptor and other membrane components; 2). The extremely low frequency pulsed electrical field could change the conformation of insulin which added to culture medium, and influence the binding capacity of insulin-insulin receptor, so as to influence cell proliferation and other metabolic activities.

**Key words:** Low frequency pulsed electrical field    Insulin and insulin receptor    Cell proliferation    Flow cytometry

## 乙醇及 6-DMAP 对小鼠卵母细胞孤雌激活的研究\*

兰国成 王子玉 马所峰 苗义良 谭景和\*\*

(山东农业大学动物科技学院 泰安 271018)

研究动物孤雌生殖现象对于了解精子在受精和胚胎发育中的作用、染色体的倍数、纯合与杂合及整倍体对胚胎发育的影响等发育生物学问题以及生产纯系动物都具有重要的意义。此外,研究化学介质对卵母细胞的激活也是了解细胞信号系统及激活动力学的重要途径。

卵母细胞人工激活方法可分为物理性刺激和化学性刺激两类。前者包括机械刺激、温度刺激以及电刺激等,后者包括酶刺激、渗透压刺激、离子刺激(如钙离子载体处理)、麻醉剂处理、放线菌酮(CHX)处理以及蛋白激酶抑制剂 6-DMAP 处理等。乙醇能使小鼠卵激活<sup>[1]</sup>,但它的激活作用与卵龄有关。新排卵子对乙醇激活处理不敏感,其激活能力随卵龄增加而提高。排卵后 3h 的卵母细胞激活率仅为 47%,而排卵后 6h 的激活率达到 90%<sup>[2-4]</sup>。在牛和山羊的细胞核移植克隆中,人们利用 6-DMAP 激活重构卵,并得到体细胞克隆动物。

许多研究都证明,乙醇浓度过高或作用时间过长都会造成卵母细胞大量死亡。由于 6-DMAP 是一种蛋白激酶抑制剂,作用时间过长也无疑会影响卵母细胞的发育能力。因此,我们实验的主要目标是探索通过乙醇和 6-DMAP 结合使用来降低二者的作用强度和作用时间,达到既保证小鼠卵母细胞的孤雌激活率,又减少对卵母细胞损伤的目的。

### 材料与方 法

#### 1. 卵母细胞的获得

在泰安市生物制品研究所购买小鼠,控光一周,暗光时间 20:00-6:00;光照时间 6:00-20:00。超排处理方法是 15:00 腹腔注射 PMSG(天津华孚高生物技术公司)10IU/只小鼠,48 小时后腹腔注射 hCG(宁波激素制品厂)10IU/只。注射 hCG18 小时,利用颈椎脱臼法处死小鼠,打开腹腔取输卵管于 M2 操作液中,用眼科镊子撕开输卵管壶腹部释

放出卵丘-卵母细胞复合体(COC)团,并使其分散开。

#### 2. 实验方法

(1) 乙醇激活:将获得的 COC 放含 5% 和 10% 乙醇的 M2 液中分别作用 5 或 10 分钟后,置于 CZB 中培养 6 小时。

(2) 6-DMAP 激活:将 COC 用含 2mmol/L 6-DMAP 的 CZB 分别培养 2、4 和 6 小时。其中,培养 2 和 4 小时的卵母细胞取出后用不含有 6-DMAP 的 CZB 再培养 4 和 2 小时。

(3) 乙醇结合 6-DMAP 激活:将 COC 放在含 5% 或 10% 乙醇的 M2 液中处理 5 分钟后,分别分两组置于含或不含 2mmol/L 6-DMAP 的 CZB 培养液中培养 6 小时。

(4) 实验结果观察:用浓度为 0.1% 的透明质酸酶作用 2-3 分钟,用直径略大于卵母细胞直径的口吸管反复吹打,脱去卵丘细胞,在相差显微镜下检查卵母细胞激活情况。只有出现 1 原核 1 极体(1PN, 1Pb)、1 原核 2 极体(1PN, 2Pb)、2 原核 1 极体(2PN, 1Pb)或 2-细胞各具一原核的卵母细胞才判断为激活。

每组实验均重复三次,每次实验均设对照组。只有在对照组卵母细胞无一激活时,实验组数据才有效。

#### 3. 数据处理

实验数据用百分数 t 检验进行统计学处理。

## 结 果

#### 1. 乙醇浓度和处理时间对小鼠母细胞孤雌激活的影响

实验中,10% 的乙醇作用 10 分钟,卵母细胞激活率最高,达到 85.6%。而 5% 的乙醇作用 10 分钟和 10% 的乙醇作用 5 分钟,结果在统计学上差异不显著,但 5% 乙醇作用 10 分钟的激活率要高一些。5% 的乙醇作用 5 分钟的激活率最低(表 1)。在激活卵的原核类型上,2-细胞的比率随着乙醇刺激强

本文 2002 年 1 月 18 日收到,5 月 28 日接受。

\* 国家科技部“973”项目(编号 G200016107)资助。

\*\* 通讯作者。

兰国成和马所峰为东北农业大学硕士研究生。

度的增加而增加。10%乙醇作用10分钟时2-细胞的比率最高,达到62.5%;5%乙醇作用5分钟2-细胞出现率最低,只有27.3%。

表1 不同浓度乙醇处理不同时间小鼠卵母细胞孤雌激活的结果

乙醇浓度	处理时间(分)	处理卵数	激活卵数			
			总数(%)	1PN	2PN	2-细胞(%)
5%	5	80	33(41.3) <sup>a</sup>	21	3	9(27.3) <sup>a</sup>
5%	10	102	65(63.7) <sup>b</sup>	20	11	34(52.3) <sup>b</sup>
10%	5	57	33(57.9) <sup>b</sup>	12	5	16(48.5) <sup>b</sup>
10%	10	85	72(85.6) <sup>c</sup>	17	10	45(62.5) <sup>b</sup>

a,b,c:同一列数据上角标中含相同字母者差异不显著( $P>0.05$ )。

## 2. 6-DMAP处理时间对小鼠卵母细胞孤雌激活的影响

实验结果(表2)表明,2mM的6-DMAP在对小鼠卵母细胞作用不同时间时,作用6小时的激活率最高,可达到40%,同作用2小时相比较,二者的差异显著( $P<0.05$ )。而2和4小时组之间相比较,差异不显著。

表2 不同浓度乙醇作用5分钟,2mM 6-DMAP作用6小时对小鼠卵母细胞激活的结果

乙醇浓度(%)	6-DMAP	处理卵数	激活卵数			
			总数(%)	1PN	2PN(%)	2-细胞(%)
5	-	80	33(41.3) <sup>a</sup>	21	3(9.1) <sup>a</sup>	9(27.3) <sup>a</sup>
5	+	55	36(65.5) <sup>b</sup>	22	14(38.9) <sup>b</sup>	0(0) <sup>a</sup>
10	-	57	33(57.9) <sup>b</sup>	12	5(15.2) <sup>a</sup>	16(48.5) <sup>c</sup>
10	+	52	52(100.0) <sup>c</sup>	19	33(63.5) <sup>c</sup>	0(0) <sup>a</sup>

a,b,c:同一列数据上角标中含相同字母者差异不显著( $P>0.05$ )。

## 讨论

在单独用乙醇对小鼠卵母细胞进行激活过程中我们发现,10%的乙醇作用10分钟的激活效果最好,激活率达到85.6%,明显优于其他各组。谭景和等证明,乙醇刺激可使小鼠卵母细胞的孤雌激活率达到90%以上,但在该实验中,将仅排出第二极体但没有形成原核的卵母细胞也判定为激活了<sup>[2]</sup>。

有关单独使用6-DMAP激活卵母细胞的报道很少。刘红林等研究了6-DMAP对小鼠裸卵的激活的作用,获得了70%以上的激活率<sup>[5]</sup>。在本实验中,单独用6-DMAP处理小鼠COCs也使卵母细胞激活,但激活率很低,最高只能达到40%。一般认为,卵母细胞的激活过程牵涉到MPF和MAPK二者的活性下降;MPF的灭活与第二次减数分裂的恢复及第二极体排除有关,而MAPK的灭活则与原核

表2 2mM的6-DMAP处理不同时间小鼠卵母细胞孤雌激活的结果

处理时间(h)	处理卵数	激活卵数			
		总数(%)	1PN	2PN	2-细胞
2	50	6(12.0) <sup>a</sup>	3	1	2
4	52	13(25.0) <sup>a</sup>	8	4	1
6	75	30(40.0) <sup>b</sup>	20	8	2

a,b:同一列数据上角标中含相同字母者差异不显著( $P>0.05$ )。

## 3. 乙醇结合6-DMAP作用对小鼠卵母细胞的激活结果

表3的实验结果表明,单独用5%或10%乙醇处理5分钟的激活率分别只有41.3%和57.9%。同样,单独用6-DMAP处理6小时的激活率也只有40%。然而,二者结合起来使用,则使激活率分别达到65.5%和100%。结合使用同单独使用相比较,激活率差异非常显著( $P<0.01$ )。其中,10%乙醇处理5分钟作为起始刺激的激活率显著高于5%乙醇处理5分钟作为起始刺激的激活率。另外,乙醇处理后经6-DMAP处理6小时使激活卵中的2-细胞比率降低到0%,而2PN的比率则显著增加。

的形成有关<sup>[6]</sup>。Naent等对海星卵母细胞研究指出,6-DMAP是通过灭活MPF的活性来引起染色体去浓缩和形成核膜的<sup>[7]</sup>。Szollosi等的研究证明,6-DMAP本身并不能灭活小鼠卵母细胞的H1激酶<sup>[8]</sup>。由于本实验中是以出现原核作为判定卵母细胞激活标准的,故造成卵母细胞激活率低的原因可能与在缺乏起始刺激的情况下,6-DMAP不能很好灭活MPF和MAPK有关。

虽然单独使用乙醇可以激活卵母细胞,而且在较高浓度和较长时间的作用下获得较高的激活率,但乙醇在高浓度下无疑会对细胞具有损伤作用。本实验中,6-DMAP单独使用得到的激活率很低,最好只有40%。因此,最好能在减少酒精对卵母细胞损伤的条件下获得较高的激活率。我们在用5%或10%的乙醇作用5分钟后,将卵母细胞置于含2mmol/L 6-DMAP的培养液中培养6小时,激活率分别达到65.5%和100%。显然,10%乙醇处理5

分钟作为起始刺激的激活率显著高于5%乙醇处理5分钟作为起始刺激的激活率。这再次说明,适当的起始刺激对于6-DMAP诱导MPF活性下降至关重要。同时也说明,可以通过将不同的激活方法适当结合使用,进行其它动物卵母细胞的孤雌激活,提高体细胞克隆的成功率。

本实验发现,乙醇处理后经6-DMAP处理6小时使激活卵中的2-细胞比率降低到0%,而2PN的比率则显著增加。Szollosi等证明,在有6-DMAP存在下培养的小鼠受精或孤雌激活卵母细胞,绝大多数不排第二极体,且为二原核类型的。他们分析,这是由于6-DMAP抑制了蛋白质的磷酸化,破坏肌动细丝与纺锤体末端的联系,阻止了纺锤体旋转而造成的<sup>[8]</sup>。我们实验中,6-DMAP抑制2-细胞、促进二原核出现的事实更进一步支持了Szollosi等的观点。

### 摘 要

实验研究了乙醇、6-DMAP以及二者联合使用时对注射hCG后18小时采集的小鼠卵母细胞孤雌激活的效果。结果证明:(1)用5%的乙醇分别作用5和10分钟及10%的乙醇分别作用5和10分钟,小鼠卵母细胞的孤雌激活率分别为41.3%、63.7%、57.9%和85.6%。说明在一定范围内,随着乙醇浓度和作用时间的增加,小鼠卵母细胞孤雌激活率有上升的趋势。(2)用2mM 6-DMAP作用2、4和6小时,小鼠卵母细胞的孤雌激活率分别为

12.0%、25.0%和40.0%。说明随着6-DMAP作用时间的增加,小鼠卵母细胞的孤雌激活率有所升高。(3)用5%乙醇作用5分钟,再用含有2mmol/L 6-DMAP的培养液培养6小时,小鼠卵母细胞的孤雌激活率可达65.5%,明显高于单独使用5%乙醇作用5分钟或单独使用2mmol/L 6-DMAP作用6小时卵母细胞的孤雌激活率。(4)用10%的乙醇作用5分钟,再用含有2mmol/L 6-DMAP的培养液培养6小时,小鼠卵母细胞的孤雌激活率达到100%,远远高于单独使用10%乙醇作用5分钟或单独使用2mmol/L 6-DMAP作用6小时卵母细胞的孤雌激活率。(5)在单独使用乙醇刺激时,激活卵母细胞中直接卵裂(2-细胞)的比率随乙醇作用强度的增加而增加,最高达62.5%;但6-DMAP则抑制激活卵母细胞的直接卵裂,增加二原核卵的比例。

关键词: 孤雌激活 乙醇 6-DMAP 卵母细胞 小鼠

### 参 考 文 献

- [1] Cuthbertson, K. R. S., 1983, *J. Exp. Zoo.*, **226**: 311 - 314.
- [2] 谭景和等, 1988, *细胞生物学杂志*, **10**: 69 - 72.
- [3] Kubiak, J. Z., 1989, *Dev. Biol.*, **136**: 537 - 545.
- [4] 邓满齐等, 1994, *实验生物学报*, **27**: 289 - 293.
- [5] 刘红林等, 1997, *实验生物学报*, **30**: 403 - 406.
- [6] 陈大元等, 2000, 《受精生物学》, 科学出版社, pp. 276 - 294.
- [7] Neant, I. et al., 1988, *Exp. cell Res.*, **176**: 68 - 79.
- [8] Szollosi, M. S. et al., 1993, *J. Cell Sci.*, **104**: 861 - 872.

## PARTHENOGENETIC ACTIVATION OF MOUSE OOCYTES BY ETHANOL AND 6-DMAP

LAN Guo Cheng WANG Zi Yu MA Suo Feng MIAO Yi Liang TAN Jing He  
(College of Animal Science, Shandong Agricultural University, Taian 271018)

### ABSTRACT

The parthenogenetic response of mouse oocytes to ethanol, 6-DMAP or both treatment was investigated in this study. Mouse oocytes collected from superovulated mice 18 hours after hCG injection were stimulated with ethanol and 6-DMAP alone or in combination. The results are as follows: 1. Activation percentages of mouse oocytes were 41.3, 63.7, 57.9 and 85.6%, respectively, when oocytes were treated with 5 and 10% ethanol for 5 and 10 minutes, indication that in this case, with the increase of ethanol concentration and duration, the oocyte activation percentage increased significantly. 2. When oocytes were cultured in CZB medium containing 2mmol/L 6-DMAP for 2, 4 and 6 hours, the activation rates were 12, 25 and 40%, respectively. 3. When oocytes were first treated in 5% ethanol for 5 min and then cultured with 2mmol/L 6-DMAP for 6h, the activation rate (65.5%) was significantly higher than that obtained by treatment with 5% ethanol or 6-DMAP alone. 4. When oocytes were cultured in CZB with 2mmol/L 6-DMAP for 6 h after treated in 10% ethanol for 5 min, the activation percentage reached 100%, markedly higher than that achieved by 10% ethanol alone. 5. When oocytes were treated with ethanol alone, with the increase of ethanol concentration and duration the percentage of 2-cell-type (immediate cleavage) activated oocytes increased significantly, but culture with 6-DMAP inhibited immediate cleavage while increased formation of two pronuclei.

Key words: Parthenogenetic activation Ethanol 6-DMAP Oocyte Mouse