

patibility complex class I. Modulation of the cell surface glycoconjugate expression was also observed in the gene-modified MCF-7 cells. It was suggested that the changes of tumor cell surface antigens and glycoconjugate expression modulated by cytokine gene transfer may be one of the most important structure basement which affect the tumor recognition and induce antitumor immunity.

Key words: Cytokine Gene-transfer MHC antigen Glycoconjugate

## 应用氯化锶和放线菌酮对小鼠卵母细胞进行孤雌活化的研究\*

李光鹏 魏 鹏 孟庆刚 孙兴参 谭景和

(东北农业大学生物工程系 哈尔滨 150030)

卵母细胞活化(activation)是影响胚胎细胞核移植成功率的关键技术环节。研究化学介质对卵母细胞的活化也是了解细胞信号系统及活化动力学问题的重要途径。排出的小鼠卵母细胞在蛋白类因子如促成成熟因子(maturation promoting factor, MPF)和其他系列作用下,停滞在 MII 中期<sup>[1,2]</sup>。这些细胞因子对  $Ca^{2+}$  敏感。当  $Ca^{2+}$  升高到一定水平时,能够破坏 CSF 进而引起 MPF 失活<sup>[3,4]</sup>,卵母细胞激活而排出第二极体和形成原核。有人认为,卵母细胞活化过程中蛋白质合成的抑制起到了仅次于  $Ca^{2+}$  升高的作用<sup>[5]</sup>。已证明,机械刺激、温度刺激、电刺激、渗透压刺激以及酶、二价阳离子、钙离子载体、乙醇、蛋白合成抑制剂等均能有效激活小鼠卵母细胞<sup>[1]</sup>。然而,对于  $SrCl_2$  引起卵母细胞活化的研究尚少<sup>[5,6]</sup>,国内还未见报道。本试验研究了  $SrCl_2$  浓度和作用时间以及卵龄和蛋白合成抑制剂放线菌酮(cycloheximide, CHX)等对小鼠卵母细胞活化的影响,为研究哺乳动物孤雌生殖和提高胚胎细胞核移植成功率提供基础数据。

### 材料与方 法

#### 1. 卵母细胞的获得

于下午 3:00 给控光(6:00—20:00 光照, 20:00—6:00 黑暗)饲养的 8—12 周龄昆明种小白鼠腹腔注射 PMSG 10 IU/只,48 小时后注射 hCG 10 IU/只。于注射 hCG 次日按所需卵龄用断颈椎法处死小

鼠,取输卵管。划破输卵管壶腹部收集卵丘-卵母细胞复合体(COC)。

#### 2. 活化处理

将 COC 洗涤 3—5 次,按不同的试验设计放入覆有石蜡油的活化液或对照组液体中,在  $37^{\circ}C$ 、5%  $CO_2$  的培养箱中进行活化处理。处理结束后,将 COC 置相应液体中洗涤 5—8 次后,转入 M16 培养液中培养 6 小时。培养结束时,用含 0.1%透明质酸酶的 M16 液脱除 COC 的卵丘细胞并洗涤 3 次后,在倒置镜下观察和记录卵母细胞活化情况。

#### 3. 活化鉴定

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-细胞各有一个原核的卵母细胞判断为活化<sup>[7]</sup>。卵质膜破裂者判断为死亡。胞质分裂一次或多次但不出现原核者判断为碎裂(fragmentation)。本试验将碎裂卵均划归未活化。每组试验均重复 3 次以上。

#### 4. 数据分析

实验数据经 t 检验进行统计学处理。

## 结 果

### 一、 $SrCl_2$ 浓度对小鼠卵母细胞活化的影响

$SrCl_2$  活化液是先用 0.9%生理盐水配制 16mmol/L 和 20mmol/L  $SrCl_2$  浓储液,使用前加无钙 M16 稀释到所需浓度。取注射 hCG 后

\* 国家教委跨世纪优秀人才基金和黑龙江省杰出青年科学基金资助项目。

18小时的COC分别在1.0、1.6、5.0和10.0 mmol/L的SrCl<sub>2</sub>活化液中处理10分钟。对照组则直接放入M16(Sigma)液中,其他处理同实验组。以含1.6mmol/L SrCl<sub>2</sub>的溶液处理hCG后18小时卵母细胞的活化率(82.7%)显著高于以含1.0mmol/L(36.2%)、5.0mmol/L(59.1%)和10mmol/L(62.8%)SrCl<sub>2</sub>的溶液处理的活化率。对照组卵母细胞无一活化(表1)。

表1 不同浓度的SrCl<sub>2</sub>处理注射hCG后18小时小鼠卵母细胞的活化结果

Sr <sup>2+</sup> 浓度 (mmol/L)	处理卵数	活化卵数 (%)	未活化卵数 (%)
0	53	0	53(100)
1.0	102	37(36.2) <sup>a</sup>	66(63.8) <sup>a</sup>
1.6	70	58(82.7) <sup>a</sup>	12(17.3) <sup>c</sup>
5.0	110	65(59.1) <sup>b</sup>	45(40.9) <sup>b</sup>
10.0	101	63(62.8) <sup>b</sup>	38(37.2) <sup>b</sup>

注:同一列中,含相同角标字母者为差异不显著(P>0.05)(下同)。

a : b 和 b : c = P < 0.05, a : c = P < 0.01

### 二、以SrCl<sub>2</sub>液作用不同时间小鼠卵母细胞的活化结果

取注射hCG后18小时的COC在1.6 mmol/L SrCl<sub>2</sub>活化液中分别处理5、10、20、30或60分钟。同时以M16液处理作为对照。注射hCG后18小时的卵母细胞经1.6mmol/L SrCl<sub>2</sub>液处理10分钟的活化率(87.0%)显著高于处理5、20、30或60分钟的活化率(见表2)。随着作用时间延长,死亡率显著提高。作用60分钟时,死亡率高达37.2%。

### 三、不同卵龄小鼠卵母细胞经SrCl<sub>2</sub>作用的活化结果

于注射hCG后14、16、18和20小时分别收集COC,在1.6mmol/L SrCl<sub>2</sub>活化液中处理10分钟。以M16液处理作为对照。注射hCG后14、16小时卵母细胞的活化率显著低于注射hCG 18和20小时卵母细胞的活化率(P<0.01)(表3)。随卵龄增加,活化率提高。而对照组各卵龄卵均无一活化(数据未列出)。

### 四、SrCl<sub>2</sub>与CHX共同作用对小鼠卵母细胞的活化效果

分别取注射hCG后14、16和18小时的

表2 注射hCG后18小时小鼠卵母细胞在1.6mmol/L SrCl<sub>2</sub>活化液中作用不同时间的活化率

作用时间 (min)	处理卵数	活化卵数 (%)	未活化卵数 (%)	死亡卵数 (%)
0	43	0	43(100) <sup>a</sup>	0
5	134	66(49.3) <sup>c</sup>	62(46.3) <sup>b</sup>	6(4.5) <sup>b</sup>
10	100	87(87.0) <sup>a</sup>	6(6) <sup>c</sup>	7(7) <sup>b</sup>
20	75	50(66.7) <sup>b</sup>	18(24) <sup>c</sup>	7(9.3) <sup>b</sup>
30	142	105(73.9) <sup>b</sup>	23(16.2) <sup>c</sup>	14(9.8) <sup>b</sup>
60	43	21(48.8) <sup>c</sup>	6(13.9) <sup>c</sup>	16(37.2) <sup>a</sup>

a : b 和 b : c = P < 0.05, a : c = P < 0.01

表3 不同卵龄小鼠卵母细胞经SrCl<sub>2</sub>作用的活化结果

卵龄 (hCG后 hr)	处理卵总数	活化卵数 (%)	未活化卵数 (%)	死亡卵数 (%)
14	104	5(4.8) <sup>a</sup>	95(91.3) <sup>a</sup>	4(3.8) <sup>a</sup>
16	103	17(16.5) <sup>a</sup>	82(79.6) <sup>a</sup>	4(3.9) <sup>a</sup>
18	110	87(79.1) <sup>b</sup>	16(14.5) <sup>b</sup>	7(6.4) <sup>a</sup>
20	65	55(84.6) <sup>b</sup>	4(6.1) <sup>b</sup>	6(9.2) <sup>a</sup>

a : b = P < 0.01

COC,经1.6mmol/L SrCl<sub>2</sub>处理10分钟。洗涤后,转入含10μg/ml CHX(Sigma)的M16液中培养6小时。对照组单独用SrCl<sub>2</sub>或CHX处理。CHX与SrCl<sub>2</sub>二者联合使用时,活化率显著(P<0.05)高于单独使用SrCl<sub>2</sub>或CHX。尤其是对注射hCG后14和16小时的幼龄卵的活化率提高更为显著(P<0.01)(表4)。

表4 SrCl<sub>2</sub>与CHX共同作用对小鼠卵母细胞的活化效果

卵龄 (注射hCG后 hr)	Sr <sup>2+</sup>	CHX	处理卵数	活化卵数 (%)	死亡卵数 (%)
14	+	+	110	63(57.3) <sup>a</sup>	2(1.8)
	-	+	57	5(8.8) <sup>b</sup>	0(0)
	+	-	104	5(4.8) <sup>b</sup>	3(2.9)
16	+	+	78	63(80.8) <sup>c</sup>	0(0)
	-	+	72	19(26.4) <sup>d</sup>	0(0)
	+	-	103	17(16.5) <sup>d</sup>	3(2.9)
18	+	+	93	87(93.5) <sup>e</sup>	2(2.6) <sup>a</sup>
	-	+	70	33(47.1) <sup>e</sup>	3(4.3) <sup>a</sup>
	+	-	65	53(81.5) <sup>f</sup>	5(7.7) <sup>b</sup>

a : b, c : d, e : f 和 f : g = P < 0.05, e : g = P < 0.01

## 讨 论

O'Neill等<sup>[6]</sup>证明,用1.6mmol/L SrCl<sub>2</sub>对注射hCG后18小时的小鼠卵母细胞进行激活时,处理5分钟与10分钟的效果一致(活化率分别为85.2和87.2%)。而且发现,活化处理40分钟和60分钟后,死亡率急剧增加,活化率下降。本试验结果也表明,活化处理10分钟的活化率显著高于5、20、30和60分钟组。随着活化时间延长,死亡率剧增,而活化率下降。本实验还证明,用1.6mmol/L浓度的SrCl<sub>2</sub>的活化效果显著优于用1.0、5.0和10.0mmol/L浓度组,表明SrCl<sub>2</sub>的浓度对小鼠卵母细胞的活化也有显著的影响。

谭景和等<sup>[7-8]</sup>用酒精和电脉冲刺激小鼠不同卵龄卵母细胞得出的结论是,新排卵子对活化不敏感,其活化能力随卵龄增加而提高。本试验结果也表明,注射hCG后14和16小时的卵母细胞活化率较低,而18和20小时的卵母细胞的活化率显著提高。这与Bos-Mikich等<sup>[5]</sup>的结果一致,说明新排出的小鼠卵母细胞对SrCl<sub>2</sub>刺激也不敏感。

关于Sr<sup>2+</sup>是如何动员内源Ca<sup>2+</sup>的机理,有人认为是Sr<sup>2+</sup>与Ca<sup>2+</sup>属于同族的二价阳离子,Sr<sup>2+</sup>可取代Ca<sup>2+</sup>的位置,通过钙泵进入细胞内而引起Ca<sup>2+</sup>多次升高<sup>[9]</sup>,导致卵母细胞活化。有研究表明,乙醇、A23187和电脉冲与CHX联合使用时,对猪<sup>[10-11]</sup>、牛<sup>[3]</sup>卵母细胞活化均有协同促进作用。我们的研究证明,Sr<sup>2+</sup>与CHX结合使用对小鼠卵母细胞活化也具有显著促进作用。Bos-Mikich等<sup>[5]</sup>认为,Sr<sup>2+</sup>可引起卵内Ca<sup>2+</sup>浓度升高,但不影响蛋白质合成;而CHX抑制蛋白质合成,但不引起或不影响内源Ca<sup>2+</sup>的释放。Sr<sup>2+</sup>与CHX的协同作用,可能与卵中的MPF有关。MPF的稳定性是靠CSF维持的<sup>[14,15]</sup>。正常受精时,精子穿入引起卵内Ca<sup>2+</sup>水平升高,灭活CSF,造成MPF失活<sup>[12,15]</sup>。当Sr<sup>2+</sup>或其他因素刺激卵母细胞时,也致使卵内Ca<sup>2+</sup>浓度升高,使已存在于卵内的CSF失活<sup>[16]</sup>。而CHX的加入,又抑制了新CSF

的合成,使MPF失活,卵母细胞离开MII期而发生活化<sup>[15,17]</sup>。

## 摘 要

本试验研究了SrCl<sub>2</sub>浓度和作用时间,以及卵龄和蛋白合成抑制剂放线菌酮等对昆明种小鼠卵母细胞活化的影响。研究表明,以含1.6mmol/L SrCl<sub>2</sub>的无钙M16液对小鼠卵母细胞活化效果最好(87.0%),显著(P<0.05)优于SrCl<sub>2</sub>浓度为1.0、5.0、10.0mmol/L的同种液体。SrCl<sub>2</sub>作用时间10分钟显著(P<0.05)好于5、20、30或60分钟。注射hCG后18和20小时卵母细胞的活化率(分别为87.0%和84.6%)显著(P<0.01)高于14或16小时的活化率(分别为4.8%和16.5%)。CHX与SrCl<sub>2</sub>联合使用产生显著的协同促进卵母细胞活化作用。

关键词: SrCl<sub>2</sub> 孤雌活化 放线菌酮 卵母细胞 小鼠

## 参 考 文 献

- [1] Kaufman, M. H., 1983, Early Mammalian Development Parthenogenetic Studies, Cambridge University Press.
- [2] Vitullo, A. and Ozil. T. P., 1992, *Dev. Biol.*, **151**:128-136.
- [3] Presicce, G. A. and Yang. X., 1994, *Mole. Reprod. Dev.*, **38**:380-385.
- [4] Collas, P. et al., 1993, *Mole. Reprod. Dev.*, **34**:224-231.
- [5] Bos-Mikich, K. et al., 1995, *Mole. Reprod. Dev.*, **41**:84-90.
- [6] O'Neill, G. T. et al., 1991, *Mole. Reprod. Dev.*, **30**:214-219.
- [7] 谭景和等, 1995, 动物学报, **41**(3): 327-331.
- [8] 谭景和等, 1988, 细胞生物学杂志, **10**:69-72.
- [9] Kline, D. and Kline, J. J., 1992, *Dev. Biol.*, **149**:80-89.
- [10] Petr, J. et al., 1996, *Theriogenology*, **45**: 1473-1478.
- [11] Nussbaum, D. J. and Prather, R. S., 1995, *Mole. Reprod. Dev.*, **41**:70-75.
- [12] Masui, Y., 1991, *Dev. Growth Differen.*, **33**:

- 543-551.
- [13] Weber, W. S. et al., 1991, *Dev. Biol.*, **148**: 393-397.
- [14] Sagata, N. et al., 1989, *Nature*, **342**: 512-518.
- [15] Presicce, G. A. and Yang, X., 1994, *Mol. Reprod. Dev.*, **37**: 61-68.
- [16] Parrish, J. J. et al., 1992, *Theriogenology*, **38**: 277-296.
- [17] Shi, Z. et al., 1993, *Theriogenology*, **38**: 309 (Abst.)

## STUDIES ON THE INDUCTION OF PARTHENOGENETIC ACTIVATION IN MOUSE OOCYTES BY STRONTIUM AND CYCLOHEXIMIDE\*

LI Guang Peng, WEI Peng, MENG Qing Gang, SUN Xing Shen, TAN Jing He  
(Department of Biotechnology, Northeast Agricultural University, Harbin, 150030)

### ABSTRACT

The experiment was conducted to study the effects of the concentration and treatment duration of strontium chloride, the egg age and the cycloheximide on the activation of mouse oocytes. The results were as follows: (1) The best activation percentage (87%) was obtained when the oocytes were treated with the calcium-free M16 medium containing 1.6 mmol/L SrCl<sub>2</sub>, significantly (P<0.05) higher than those obtained with the calcium-free M16 media containing 1.0, 5.0 or 10.0 mmol/L SrCl<sub>2</sub>; (2) The activation rate achieved when the oocytes were treated with the calcium-free M16 medium containing 1.6 mmol/L SrCl<sub>2</sub> for 10 min was significantly (P<0.05) higher than those achieved when the oocytes were treated with the same medium for 5, 20, 30 or 60 min; (3) The activation rates in the oocytes collected 18 and 20 hours post hCG injection (87% and 84.6%, respectively) were significantly higher than those in the oocytes recovered 14 and 16 hours post hCG (4.8% and 16.5%, respectively), when they were treated under the same conditions; (4) The activation rate was increased further when oocytes were cultured in the medium supplemented with CHX after stimulation with SrCl<sub>2</sub>, indicating that the two drugs have synergistic effect on oocyte activation.

**Key words:** SrCl<sub>2</sub> Parthenogenetic activation Cycloheximide Oocyte Mouse

\*Supported by grants from the Trans-century Talent Foundation of China Education Commission and the Heilongjiang Provincial Foundation for Outstanding Young Scientists.

### 经验交流

## EPO 工程细胞株支原体检测

陈琳 徐秀英

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

细胞培养过程中常常出现支原体污染,污染严重时,可造成细胞一系列生物学性质的改变,甚至使基因工程细胞表达产物不能应用。因此,鉴定工程细胞株时,排除支原体污染是其中

一个重要项目。目前,检测支原体的方法很多,

本工作得到我院微生物流行病学研究所辛颜彬和魏云玲老师的帮助,谨致谢意。