

小鼠不同卵龄卵母细胞电刺激后 第二极体形成和原核发育的研究*

谭景和 杨婵云 周 琪 初振辉 贺桂馨 秦鸣春
(东北农业大学 哈尔滨 150030)

正常情况下,小鼠卵母细胞是在第二次减数分裂中期(M II)期间受精。精子使卵母细胞活化,排出第二极体,完成第二次减数分裂并过渡到第一次卵裂间期。Iwamatsu等^[1]证明,精子不能活化未成熟卵母细胞;精核不形成原核,而是变成高度浓缩的染色质团。Clarke等^[2]发现,进入第一次减数分裂中期(M I)卵母细胞的精核形成致密染色体。Clarke等^[3]还证明,用药物抑制蛋白质合成可迫使M I卵母细胞进入间期,但其核不能启动DNA复制,且一旦解除药物抑制其染色质便恢复致密状态。然而,抑制M II卵母细胞蛋白质合成,则诱导其发生真正的孤雌活化^[4]。上述资料足以说明,小鼠卵母细胞是在其成熟过程中逐渐获得活动能力的。Kubiak^[5]最近又证明,刚进入M II期的小鼠卵母细胞对酒精刺激不发生任何反应;到卵母细胞刚获得进行第二次减数分裂后期活动的的能力时,其对酒精刺激的反应是不完全的;排出第二极体后不进入间期而是再次遏止在中期(M III);最后,卵母细胞才获得完全活化、顺利进入间期的能力。他还发现,卵母细胞获得受精子刺激活化的能力的时间要早于获得受酒精刺激活化能力的时间。

本实验观察了排卵后不同时间小鼠卵母细胞受电刺激后的第二极体形成和原核发育情况,以探明小鼠卵母细胞获得电刺激活化能力的时间及原核发育速度等问题。

材 料 与 方 法

1. 卵母细胞来源:下午3点腹腔注射PMSG(10 IU),隔48小时注射hCG(10 IU),对8—12周

龄昆明小白鼠进行超数排卵。注射hCG后13、15、17和19小时用断颈椎法杀鼠,划破输卵管壶腹部收集卵丘团。经3%柠檬酸钠振荡和透明酸酶(500 IU/ml)处理,去掉卵丘,获得卵母细胞并置M₂培养液^[6]中洗3次后备用。

2. 电刺激:应用中科院发育生物学研究所制的KeFa-450型细胞电融仪和自制的由两条铂金片(0.4 mm × 4 mm × 30 mm)构成的平板电极进行电脉冲刺激。电刺激前,将0.3 mol/L甘露醇溶液(含0.1 mmol/L MgSO₄和0.05 mmol/L CaCl₂)注入电极之间,做成小滴。将卵母细胞自M₂中移到0.3 mol/L甘露醇溶液内平衡1—2分钟,待卵母细胞沉底后再移到电极之间的甘露醇滴中,以场强0.45 kV/cm,持续不同时间(80, 160, 320和640 μs)的一次电脉冲进行刺激。

3. 卵母细胞培养和活化情况检查:电刺激后卵母细胞经M₂洗2次,放Whitten培养液^[7]滴中,盖石蜡油,37℃CO₂培养箱内培养。对照组卵母细胞不经甘露醇和电刺激,直接放Whitten液中培养。培养6小时和9小时,分别用倒置光学显微镜观察,检查卵母细胞第二极体和原核形成情况。凡出现1原核1极体(1PN, 1PB)或1原核2极体(1PN, 2PB),或2原核1极体(2PN, 1PB)或2-细胞各有一个原核的卵母细胞才判定为活化。凡出现第二极体,无原核形成者判定为M III期卵母细胞。每次实验,只有当对照组卵母细胞无一活化时,实验组数据才有效。

结 果

1. 注射hCG后不同时间小鼠卵母细胞经电刺激并培养6小时的原核及第二极体形成情况

实验证明^[8],在0.45 kV/cm场强下,持续

* 国家教委霍英东青年教师基金项目。

表1 注射hCG后不同时间小鼠卵母细胞电脉冲(0.45 kV/cm, 持续160—640 μs)刺激后培养6小时活化和2 PB形成情况

注 hCG 后小时	卵母细胞数(%)			
	处 理	活 化	未 活 化	未活化有 2 PB 的
13	245	8(3.3)	220(89.8)	49(20)(22.2)*
15	261	105(40.2)	100(38.3)	43(16.5)(43)
17	840	474(56.4)	202(24)	83(9.9)(41)
19	325	220(67.7)	62(19.1)	31(9.5)(50)

* 占未活化卵母细胞数的%。

表2 电刺激小鼠卵母细胞培养6和9小时原核形成情况

hCG 后 小 时	培 养 时 间 (小时)	卵母细胞数(%)									
		80 μs		160 μs		320 μs		640 μs		合 计	
		处 理	活 化	处 理	活 化	处 理	活 化	处 理	活 化	处 理	活 化
13	6		72	0(0)	79	1(1.27)	19	7(36.8)	170	8(4.7)	
	9		72	1(1.4)	79	5(6.3)	19	8(42.1)	170	14(8.2)	
15	6		45	9(20)	42	16(38.1)	36	11(30.6)	123	36(29.3)	
	9		45	11(24.4)	42	20(47.6)	36	13(36.1)	123	44(35.8)	
17	6	161	54(33.5)	147	65(44.2)	275	133(48.4)	90	43(47.8)	673	295(43.8)
	9	161	66(41)	147	80(54.4)	276	161(58.3)	90	43(47.8)	674	350(52)
19	6	34	19(55.9)	81	53(65.4)	116	76(65.5)	71	48(67.6)	302	196(64.9)
	9	34	23(67.7)	81	60(74.1)	116	80(69)	71	50(70.4)	302	213(70.5)
合 计	6	195	73(37.4)	345	127(36.8)	512	226(44.1)	216	109(50.5)	1268	535(42.2)
	9	195	89(45.6)	345	152(44.1)	513	266(51.8)	216	114(52.8)	1269	621(48.9)

160、320 和 640 μs(微秒)的电脉冲,对注射 hCG 后不同时间小鼠卵母细胞的活化率差异均不显著。本实验则统计了注射 hCG 后不同时间获取的小鼠卵母细胞经 0.45 kV/cm 场强、持续 160—640 μs 的一次电脉冲刺激后培养 6 小时活化和第二极体(2 PB)形成情况(表 1)。结果说明,卵母细胞活化率随卵龄增加而升高;由注射 hCG 13 小时的 3.3% 增加到注射 hCG 后 19 小时的 67.7%。未活化卵母细胞形成第二极体(MⅢ)者也随卵龄增加而明显增多;注射 hCG 后 13 小时未活化卵母细胞只有 22.2% 形成第二极体,注 hCG 后 15 和 17 小时未活化的卵母细胞形成第二极体的比例在 42% 左右。注 hCG 19 小时未活化卵母细胞形成第二极体的比例达 50%。然而, MⅢ 卵母细胞占处理卵总数的百分比则随卵龄增加而明

显下降(由 20% 下降到 9.5%)。

2. 电脉冲刺激后小鼠卵母细胞体外培养的原核发育情况

卵母细胞电刺激后培养 6 小时和 9 小时,分别进行观察,以确定卵母细胞的原核发育情况。结果(表 2)是,经不同电刺激处理的卵母细胞,培养 9 小时的总活化率比培养 6 小时增加了 6.7%;亦即在培养 6 小时到 9 小时这段时间里又有 6.7% 卵母细胞形成了原核。其中, 80、160 和 320 μs 三组电刺激的卵母细胞的活化率平均增加 8% 左右,而 640 μs 组卵母细胞的活化率仅增加 2%,明显低于平均水平;说明脉冲持续时间为 640 μs 时,原核形成较早或较快。在注射 hCG 后 13、15、17 和 19 小时的卵母细胞,培养 6 小时和 9 小时观察的活化率分别增加了 3.54%、6.5%、8.1% 和

5.6%。

讨 论

Kubiak^[6]用酒精刺激活化小鼠卵母细胞时发现,有些刚排出的卵母细胞在受刺激后,不发生任何反应,仍然停留在MⅡ期;另有一些卵母细胞则只形成第二极体,不出现原核,即停止在MⅢ期。他还证明,卵母细胞获得活化能力的时间依刺激方式而异。为研究电刺激小鼠卵母细胞是否也有MⅢ现象以及小鼠卵母细胞获得电刺激活化能力的时间,本实验观察了排卵后不同时间小鼠卵母细胞受电刺激后的活化和二极体形成情况。结果证明,卵母细胞的完全活化(形成原核)率随卵龄增加而明显升高;未活化卵母细胞形成第二极体(MⅢ)者随卵龄增加而明显增多;MⅢ卵母细胞占处理卵总数的比例随卵龄增加而明显下降。这说明:(1)电刺激小鼠卵母细胞也有一部分进入MⅢ期;(2)随卵龄增加卵母细胞电活化能力增强,未活化卵进入MⅢ的能力也增强。尽管随卵龄增加进入MⅢ卵母细胞比例明显下降,但直到注射hCG后19小时仍有部分卵母细胞进入MⅢ期;同时,尽管此时未活化卵母细胞形成第二极体者多达50%,但仍有50%未能形成第二极体。因此,卵龄并非是影响卵母细胞活化和进入MⅢ的唯一因素。要提高卵母细胞活化率,还应从刺激方式、强度等其他方面考虑。

进行小鼠卵母细胞孤雌活化的常规做法是于刺激后培养5—6小时观察活化情况^[9],这是根据小鼠受精后3—6小时排除第二极体和形成原核^[10]来确定的。本实验对某些电刺激卵母细胞分别于培养6小时和9小时进行观察,以确定:(1)孤雌活化卵母细胞培养6小时后是否还有原核形成;(2)不同电场条件刺激不同卵龄卵母细胞的原核形成速度有无差异。结果发现,培养9小时观察各种处理卵母

细胞的总活化率比培养6小时观察的增加了6.7%;说明电刺激培养6小时以后仍有原核形成,其原因和意义有待进一步探讨。其中80、160和320 μ s三组处理卵母细胞的活化率平均增加8%左右,而640 μ s组卵母细胞的活化率仅增加2%,明显低于平均水平;说明脉冲持续时间为640 μ s时,原核形成较快或较早。卵龄对原核形成速度影响不明显。

摘 要

实验以强度为0.45 kV/cm,持续不同时间(80、160、320、640 μ s)的电脉冲刺激不同卵龄(注hCG后13、15、17、19小时)小鼠卵母细胞,观察电刺激后第二极体形成和原核发育情况。实验结果说明:(1)卵母细胞完全活化(形成原核)率随卵龄增加而明显升高;(2)电刺激小鼠卵母细胞也出现MⅢ现象,未活化卵母细胞形成第二极体(MⅢ)者随卵龄增加而明显增多;(3)电刺激活化小鼠卵母细胞在培养6—9小时之间仍有6.7%形成原核。

参 考 文 献

- [1] Iwamatsu, T. et al., 1972, *J. Reprod. Fertil.*, 31: 237—247.
- [2] Clarke, H. J. et al., 1986, *J. Cell Biol.*, 102: 1039—1046.
- [3] Clarke, H. J. et al., 1983, *Dev. Biol.*, 97: 291—301.
- [4] Siracusa, G. et al., 1978, *J. Embryol. Morphol.*, 43: 157—166.
- [5] Kubiak, J. Z., 1989, *Dev. Biol.*, 136: 537—545.
- [6] Hogan, B. et al., 1986, "Manipulating the Mouse Embryo" Cold Spring Harbor Laboratory, PP. 252—253.
- [7] Gwatkin, R. B. L. et al., 1972, *J. Reprod. Fertil.*, 30: 384—394.
- [8] 谭景和等, 1993, 整理待发表。
- [9] 谭景和等, 1988, 细胞生物学杂志, 10: 69—72.
- [10] Hogan, B. et al., 1986, "Manipulating the Mouse Embryo" Cold Spring Harbor Laboratory, PP. 107—108.