

卵龄和培养液中青霉素浓度对小鼠卵母细胞酒精孤雌活化效果的影响

谭景和 秦鹏春 马 骥
(东北农学院)

引 言

许多哺乳动物的卵子都能在没有雄性配子参与的情况下进行自发发育^[1-3], 这种现象叫作孤雌生殖(Parthenogenesis), 它对了解精子在受精过程中的作用具有重要意义。例如, 应用不同的人工孤雌生殖方法可以把卵子活化的各个过程(如皮质反应, 减数分裂的恢复和发育到第一次卵裂的过程)分开来研究^[4]。此外, 经孤雌生殖而产生的单倍体和纯合双倍体细胞系在各种遗传学研究中都具有极其重要的价值; 长远看来, 对研究肿瘤的发病机理和诱发突变也具有重要意义^[5]。

哺乳动物卵子的人工孤雌活化方法有多种, 其中如: 改变温度和渗透压, 用透明质酸酶处理, 用针机械刺激、电刺激以及用二价离子载体 A 23187 处理等^[6]。新近发明的用酒精活化小白鼠卵子的方法, 被认为是最有前途的人工孤雌活化方法; 因为它能较好地模仿精子的刺激, 引起卵子发生一系列类似于受精过程的生理生化变化。其中如皮质颗粒反应^[4], 钙离子浓度的升高^[7]等。应用这种方法活化的小白鼠卵子可以发育到囊胚阶段^[8]。然而到目前为止, 还没有一种单纯的孤雌活化方法能产生出个体。因此, 有必要对影响人工孤雌活化的因素做详细的研究, 以便最终培育出哺乳动物的孤雌生殖个体。

本实验主要研究了小鼠卵在排卵后卵龄和培养液中的青霉素浓度对小鼠卵酒精孤雌活化效果的影响, 找出了 N:NIH 品系小鼠进行酒

精孤雌活化的最佳卵龄和卵子培养的最适青霉素浓度, 为更好地利用酒精孤雌活化方法, 使孤雌活化胚发育到更高阶段提供了一些必要的基础数据。

材 料 和 方 法

用国产激素孕马血清促性腺激素(PMSG)和人绒毛膜促性腺激素(HCG)对 8—12 周龄 N: NIH 小白鼠进行超排, 注射 HCG 后 12.5—13 小时排卵。排卵后不同时间(3、4.5、6、9 和 12 小时)用颈部脱臼法处死小鼠, 用杜氏液冲洗输卵管, 收集卵子。卵子经培养液洗两次后, 立即置于含 10% 酒精的培养液中, 在室温下温育 10 分钟。接着, 取出卵子, 用新鲜温培养液洗三次, 放在液体石蜡油下做成的培养滴中, 并置于 CO₂ 培养箱内(5% CO₂, 37°C)培养 5—6 小时后, 用含国产透明质酸酶(300 U/ml)的培养液去掉卵丘细胞, 在相差显微镜下观察卵子活化情况和照像。对照组卵子置于不含酒精培养液中在室温下停留 10 分钟, 其它步骤和实验组一样。另一组排卵 6 小时的卵子用含不同剂量青霉素的培养液进行上述各步处理, 以便观察青霉素浓度对小鼠卵母细胞酒精孤雌活化效果的影响。

结 果 与 讨 论

一、卵龄对小白鼠卵母细胞酒精孤雌活化效果的影响

排卵后不同时间取出的小白鼠卵母细胞经 10% 酒精刺激后的活化情况是不一样的(见表 1)。排卵后 6 小时收集的卵母细胞受刺激后活化效果最好, 活化率达 90%; 其次是排卵

感谢应红同志在实验中的辛勤劳动。

表1 排卵后不同时间取小白鼠卵母细胞经10%酒精孤雌活化情况

时 间 (小时)	小 鼠 个体数	处理卵 总 数	活 化 卵 数 (占处理卵%)	2 细胞和 2 原核活化卵数 (占活化卵%)	碎 裂 卵 数 (占处理卵%)
3	4	76	36 (47)	16 (44)	
4.5	4	100	55 (55)	23 (42)	2 (2)
6	5	58	52 (90)	23 (44)	
9	4	90	66 (73)	40 (61)	
12	3	63	31 (49)	6 (19)	19 (30)

后9小时的卵母细胞,其活化率在73%;再次为排卵后4.5小时的卵母细胞,其活化率为55%;活化率最低的是排卵后3小时和排卵后12小时的卵母细胞,仅为47%和49%。这与Dyban等人^[9]所做的小鼠卵活体内酒精孤雌活化的结果基本一致。但体外酒精活化的效果要比体内好得多。关于新排卵子孤雌活化效果不好的原因,有人认为只有经输卵管中的某些内容物作用于卵子后,才容易发生孤雌活化。到排卵后12小时,此时有部分卵子已经开始老化^[10],其活化率可能降低。排卵后9小时小鼠卵母细胞活化后形成的2细胞和2原核数目高于6小时以前的卵母细胞(表1)。但生物统计结果差异不显著($p>0.05$)。尽管如此,这种趋势也可能说明,由于卵母细胞排卵后在输卵管内停留一段时间后,其纺锤体发生旋转和内移^[11]致使形成2细胞和2原核的孤雌活化卵数增多。另外一点值得注意的是,排卵后12小时卵母细胞经酒精作用后有很多(30%)发生胞质碎裂现象。这说明卵母细胞老化后是不能进行正常孤雌活化发育的。

二、培养液中青霉素浓度对排卵6小时小白鼠卵母细胞酒精孤雌活化效果的影响

本实验证明:小白鼠卵母细胞经酒精刺激后的孤雌活化率与培养液中的青霉素浓度成反比。从表2中可以看出,当青霉素浓度为1000 IU/ml培养液时,卵母细胞的孤雌活化率最低,仅为54%,而且出现卵子碎裂现象;在青霉素浓度为500 IU/ml时,活化率为59%;

表2 培养液中不同浓度青霉素对排卵6小时小白鼠卵母细胞酒精孤雌活化效果的影响

青 霉 素 浓 度 (IU/ml)	小 白 鼠 个 体 数	处理卵 总 数	活 化 卵 数 (占处理卵 数%)	碎 裂 卵 数 (占处理卵数%)
1000	4	171	93 (54)	11 (6)
500	4	115	68 (59)	
100	4	66	51 (77)	
50	5	70	68 (97)	

青霉素浓度为100 IU/ml时,活化率为77%;当青霉素浓度降低到50 IU/ml时,活化率竟达到97%。应当指出,每毫升培养液中加100 IU青霉素,是一般进行卵母细胞培养、体外受精和胚胎培养等常用的抗菌素浓度。这样的浓度既然能降低卵母细胞的孤雌活化率,可以想象它也会影响活化后卵母细胞的发育能力。或许这就是孤雌活化胚胎不能发育到更晚时期的原因之一。这些都有待于进一步研究。至于青霉素降低小白鼠卵母细胞孤雌活化率的机理,我们可以从青霉素对细菌的作用上来考虑。大家都知道,青霉素是通过抑制细菌合成一种细胞壁上的多肽来杀菌的。卵母细胞的孤雌活化和受精过程一样,都需要有蛋白质的合成^[12]。高浓度青霉素可能会影响卵母细胞的蛋白质合成过程,从而影响其活化。

三、小白鼠卵母细胞酒精孤雌活化的主要发育途径

未经酒精活化的卵子(对照组)处于第二次成熟分裂中期,为一极体无原核(1 PB, 0 PN)型(图1)。

经酒精活化后的小白鼠卵母细胞主要发育途径有:一极体一原核(1 PB, 1 PN)型(图2);一极体二原核(1 PB, 2 PN)型(图3);一极体二细胞(1 PB, 2-Cell)型(图4、5);二极体无原核(2 PB, 0 PN)型(图6);和二极体一原核(2 PB, 1 PN)型(图7)。将二极体卵机械去除透明带后,可见第二极体经纤维状结构与卵细胞质相连(图8),而第一极体则脱落。除此之外,还发现有三细胞,四细胞或多细胞同时分裂的现象(图9、10和11),以及卵裂球以类似于螺旋式卵裂的方式排列的特殊现象(图12)。进行三细胞直接卵裂时,可见到每个卵裂球中都含有核,但找不到第二极体。这可能是由于经酒精刺激后,卵母细胞与第二极体未完全分开,接着又开始了直接卵裂而造成的。其发育前途如何,尚有待探讨。多细胞直接卵裂时,只见有几个细胞中含有核,其余的只是细胞质。这可能说明,多细胞直接卵裂是卵母细胞发生碎裂的方式之一,是退化性变化。

哺乳动物的孤雌活化工作,有许多问题尚待研究解决。最近, Surani 等人^[13]将小鼠孤雌生殖胚内细胞群注射到正常囊胚的囊胚腔中,形成嵌合体,出生了嵌合小鼠。其中一雌嵌合小鼠用其来源于孤雌生殖胚的生殖细胞产生后代。Markert 等人^[14]将用受精后去雄原核的方法产生的孤雌生殖8细胞胚与正常8细胞胚相聚合而营救了孤雌生殖胚,产生了一些嵌合体小鼠,其中一雌鼠从其单亲纯合的生殖细胞产生出后代。这说明通过孤雌活化方法产生的嵌合体可以用于培育动物新品种,并可大大缩短育种时间,对动物育种工作具有非常重大的意义。

摘 要

本实验结果说明 N:NIH 小鼠排卵后 6 小时的卵母细胞酒精孤雌活化率最高,达 90%。

卵母细胞的孤雌活化率与培养液中的青霉素浓度成反比。

卵母细胞经酒精活化后的主要发育途径,除其他人报道的一极体一原核(1 PB, 1 PN),一极体二原核(1 PB, 2 PN),一极体二细胞(1 PB, 2-Cell),二极体无原核(2 PB, 0 PN)和二极体一原核(2 PB, 1 PN)型之外,还发现有三细胞,四细胞,四细胞或多细胞直接分裂的现象,以及卵裂球以类似螺旋式卵裂的方式排列的特殊现象。

图 片 说 明

酒精刺激后 5~6 小时, N:NIH 小白鼠卵母细胞孤雌活化类型(相差显微照像)

- 图 1 对照组卵母细胞, 仅一个极体。400 ×
- 图 2 一极体一原核(1 PB, 1 PN)型。400 ×
- 图 3 一极体二原核(1 PB, 2 PN)型。400 ×
- 图 4 一极体二细胞(1 PB, 2-Cell)型。400 ×
- 图 5 一极体二细胞(1 PB, 2-Cell)型, 但其两个原核都位于一个卵裂球中, 另一个卵裂球没有原核。500 ×
- 图 6 二极体无原核(2 PB, 0 PN)型。400 ×
- 图 7 二极体一原核(2 PB, 1 PN)型。500 ×
- 图 8 二极体一原核(2 PB, 1 PN)型, 去透明带后的活化卵母细胞, 第二极体由一纤维状结构与卵细胞质相连。500 ×
- 图 9 3 细胞直接卵裂型。500 ×
- 图 10 3 细胞直接卵裂型。500 ×
- 图 11 多细胞直接卵裂型。400 ×
- 图 12 二卵裂球以类似螺旋卵裂的方式排列。500 ×

参 考 文 献

- [1] Beaty, R. A., 1967, In "Fertilization" Ed. by C. B. Metz and A. Monroy, Academic Press, New York.
- [2] Tarkowski, A. K., 1971, *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 14 : 31-39.
- [3] Graham, C. F. 1974, *Biol. Rev.* 49 : 399-422.
- [4] Gulyas, B. J. et al., 1985, *J. Exp. Zool.* 233 : 269-276.
- [5] Kaufman, M. H., 1983, "Early Mammalian Development: Parthenogenetic Studies" Cambridge University Press.
- [6] Gwatkin, R. B. L., 1977, "Fertilization Mechanism in Man and Mammals", Plenum Press. New York and London.
- [7] Cuthbertson, K. S. R. et al., 1981, *Na-*

- ture, 294 : 754.
- [8] Cuthbertson, K. S. R. et al., 1983, *J. Exp. Zool.* 226 : 311—314.
- [9] Dyban, A. P. et al., 1980, *Bull. Exp. Biol. Med.* 89 : 528—530.
- [10] Longo, F. J., 1980, *Gamete Res.* 3 : 379—393.
- [11] Szollosi, D., 1975, In "Aging Gametes" Ed. by R. J. Blandau, pp. 98—121, Karger, Basel.
- [12] Petzolt, U. et al., 1980, *Molec. gen. Genet.* 180 : 547—552.
- [13] Surani, M. A. H. et al., 1977, *Nature (London)* 270 : 601—603.
- [14] Christopher, A. and C. L. Markert, 1986, In "International Minisymposium on Developmental Biology, Proceedings", Beijing, 1986., 10, pp. 1—10.

B7-2 胚胎性癌细胞与其分化细胞的周期特性*

丛笑倩 施渭康

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

近年来,小鼠恶性畸胎瘤研究使有可能分析哺乳动物早期发育和肿瘤发生中复杂的生物学问题;就发育潜能而言,恶性畸胎瘤干细胞——胚胎性癌(简称EC)细胞极类似于胚泡的内细胞团(ICM)细胞,可作为研究早期哺乳类发育中某些问题的模型^[1,2];同时,鉴于EC细胞在一定条件下能直接分化成非恶性的细胞,因此又可用以探讨肿瘤生物学的一些问题^[3,4]。我们曾报道,B7-2多能EC细胞克隆株在体外能保持较均一的未分化状态,经环六亚甲基双乙酰胺(HMBA)体外处理能被诱导分化为内胚层性质的细胞。在诱导分化过程中,细胞发生了P53转化蛋白、植物凝集素受体等表型转变。同时,细胞增殖速率明显减缓。接种到同系宿主皮下,失去原有的恶性生长性质^[5,6]。然而,细胞分化期间,细胞周期的时相变化参数迄今还未被完全阐明。本文报道了B7-2 EC细胞经HMBA处理前后两种不同表型的细胞周期特点,为分析EC细胞诱导分化的基因表达与周期关系提供了参数。

材 料 和 方 法

一、细胞株和诱导剂HMBA处理

1 未分化细胞 B7-2 EC细胞^[5]生长在含10%

小牛血清的RPMI-1640培养液中,不经胰酶消化,每隔三天传代一次。对数生长期的细胞悬浮于培养液,以每毫升 1×10^5 细胞接种5毫升于 $2.5 \times 5 \text{ cm}^2$ 培养瓶中,瓶塞上插上一注射针头,置5%CO₂培养箱,37℃培养72小时,这时细胞又处于对数生长期。

2 分化细胞 对数生长的B7-2 EC细胞悬浮在含5 mol/L HMBA和10%小牛血清的RPMI-1640培养液中,使每毫升细胞数为 1×10^5 。接种10毫升细胞悬液于 $3.5 \times 7 \text{ cm}^2$ 培养瓶,置5%CO₂、37℃培养。由于B7-2细胞用HMBA处理48小时后,90%的细胞已完成定向分化^[6]。因此,细胞经药物处理96小时后,换以不含诱导剂HMBA的新鲜培养液,按实验要求继续培养不同时间。

二、细胞生长曲线

经HMBA处理96小时的B7-2分化细胞,根据继续培养在无诱导剂的常规培养液中的时间,分为24,48,72和96小时四组。每组各取3瓶细胞,0.25%胰酶消化,收集细胞,计数,取平均值作出分化细胞的生长曲线。未分化B7-2细胞的生长曲线测定同分化细胞,分别对相应于分化细胞接种后培养的时间进行细胞计数。

* 本文由中国科学院R 850595号基金资助,并承姚鑫教授指导,包林平同志参加实验。部分内容收集于中国细胞生物学学会第3次会议论文摘要汇编,1986年10月,成都。