

82-86

第25卷 第3期
1997年6月西北农业大学学报
Acta Univ. Agric. Boreali-occidentalisVol. 25 No. 3
Jun. 199718
小鼠卵母细胞的孤雌激活及体外发育寇全安 李裕强[✓] 张美佳 张 涌

(西北农业大学动物医学系, 陕西杨陵 712100)

摘要 分别用不同条件的电脉冲、酒精浓度刺激不同卵龄的小鼠卵母细胞, 进行体外培养并观察卵母细胞的活化和体外发育情况。结果表明, ①以场强 55 V/mm, 脉宽 160 μ s 的电脉冲刺激卵龄为 17 h 的卵母细胞, 活化卵形成二原核率为 90%; 以场强 55 V/mm, 脉宽 640 μ s 的电脉冲刺激卵龄为 15 h 的卵母细胞, 激活卵的桑椹胚最高发育率为 69%。②用 7% 酒精刺激卵龄为 15 h 的卵母细胞 2 min, 活化率最高为 72%, 激活卵的桑椹胚发育率为 22.2%。

关键词 卵母细胞, 电脉冲, 酒精, 孤雌生殖, 小鼠

中图分类号 S814.6, S865.130.3 5865-133

研究哺乳动物卵母细胞的孤雌激活及体外发育, 有助于探索卵母细胞的生理反应, 分析理化因素激活与精子激活的特征, 有助于了解哺乳动物早期胚胎的发育机理。经孤雌生殖产生的单倍体和纯合体细胞在遗传育种上有着重要的意义。此外, 卵母细胞激活和孤雌发育的研究还能为核移植技术的进一步完善提供理论和实验依据。卵母细胞激活的方法较多, 如乙醇处理、温度和渗透压的改变、机械刺激、钙离子载体 A23187 处理、透明质酸酶处理、氯化铯处理、电刺激和蛋白质合成抑制剂处理等^[1]。然而, 由于各研究者采用的激活方法、培养条件以及动物种类不同, 所得结果也不尽相同。本试验试图找出电激活、酒精激活小鼠卵母细胞的最佳条件并观察其体外发育情况, 为小鼠卵母细胞的激活研究提供数据和资料, 为其他动物的有关研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 卵母细胞的采集

对 20~25 g 昆白小鼠每只皮下注射 8 IU PMSG, 间隔 48 h 皮下注射 10 IU hCG 进行超排。分别于注射 hCG 后 15, 17, 19 h, 用颈椎脱臼法杀死小鼠, 无菌取出输卵管, 在实体显微镜下, 收集卵丘-卵母细胞复合体(COC), 然后将 COC 移入浓度为 2 g/L 透明质酸酶的 PBS 液中作用 2~3 min, 同时用吸管吹打, 去掉卵丘细胞, 获得裸卵备用。

1.2 卵母细胞的激活和培养

1.2.1 电激活和培养 电刺激前, 将卵母细胞在电激活液(0.3 mol/L 甘露醇溶液内含 0.1 mmol/L $MgSO_4$ 和 0.05 mmol/L $CaCl_2$)中平衡 2~4 min, 然后将卵母细胞注入含电激活液的电融合槽中, 用异物针拨正卵母细胞, 使第一极体与卵母细胞的界面和电流方向垂直。电激活条件为: 场强 55 V/mm, 脉宽分别为 160, 320, 640 μ s, 一个电脉冲。上述卵母细胞培养前用 TCM199 洗 3 次, 然后在 TCM199 培养液中进行微滴培养(38.5 $^{\circ}C$, 体积分

收稿日期 1996-11-19

作者简介 寇全安, 男, 1972 年生, 硕士研究生

数5%的CO₂,饱和湿度)。在培养6和9h进行检查,其后隔时观察发育情况。

1.2.2 酒精激活和培养 将注射hCG后15h的裸卵分别置于体积分数为0%,1%,3%,5%,7%,9%,11%酒精浓度的PBS液中,作用不同时间(0.5,1,2,3,4 min)后取出,在M199液中平衡2 min后移入含5 μg/mL细胞松弛素B的M199中进行培养(39.0℃,体积分数为5%的CO₂,饱和湿度)。4 h后取出培养皿,将卵母细胞在M199中洗3次,然后在M199液中继续培养4 h后观察活化情况,其后隔时观察。

1.3 卵母细胞活化的判断标准

形成原核或发生卵裂。

2 结果

2.1 电刺激对卵母细胞的活化及体外发育的影响

2.1.1 不同脉宽电脉冲对卵母细胞活化率的影响 对不同卵龄的小鼠卵母细胞进行激活处理,结果(表1)表明,各组活化率差异不显著($P>0.05$)。电刺激形成两个原核的卵母细胞占活化卵母细胞总数的百分率为61.8%。其中卵龄17 h,脉宽160 μs电脉冲刺激形成二原核的卵母细胞占活化卵母细胞的比率最高(90%);而卵龄15 h,脉宽160 μs形成二原核的卵母细胞占活化卵母细胞的比率最低(29.2%)。

表1 电刺激对卵母细胞活化的影响

卵龄(h)	脉宽(μs)	卵数(枚)	活化数(枚)	活化率(%)	2PN数/1PN数	2PN数占活化数百分率(%)
15	160	40	24	60.0	7/16	29.2
	320	53	31	58.5	15/16	48.4
	640	62	29	46.8	20/9	69.0
17	160	38	20	52.6	18/2	90.0
	320	36	21	58.3	18/3	85.7
	640	23	12	52.2	5/7	41.7
19	160	24	10	41.7	7/13	70.0
	320	22	11	50.7	9/2	81.8
	640	21	7	33.3	3/4	42.9
合计		319	165	51.7	102/63	61.8

注:卵龄为注射hCG后的时间。

2.1.2 培养时间对电脉冲刺激后的卵母细胞活化的影响 结果(表2)表明,卵龄15,17,19 h的卵母细胞电刺激后培养9 h的活化率比6 h分别提高13.6%,8.3%和28.4%,脉宽160,320,640 μs电刺激卵母细胞培养9 h的活化率比6 h分别高20.5%,12.7%,12.3%。经过不同电刺激的卵母细胞,培养9 h的总活化率较6 h提高15%。

2.1.3 电刺激对激活卵母细胞发育的影响 对不同卵龄卵母细胞进行不同的电刺激,激活卵的发育能力不同。由表3可以看出,在卵龄15 h、脉宽640 μs和卵龄17 h、脉宽160 μs条件下,激活卵的桑椹胚发育率较高,分别为69.0%和50.0%。

表 2 培养时间对电刺激后卵母细胞活化的影响

卵龄 (h)	培养 时间 (h)	160 μ s			320 μ s			640 μ s			合计		
		处理 (枚)	活化 (枚)	活化率 (%)	处理 (枚)	活化 (枚)	活化率 (%)	处理 (枚)	活化 (枚)	活化率 (%)	处理 (枚)	活化 (枚)	活化率 (%)
15	6	40	8	20	53	21	39.6	62	11	17.7	155	40	25.8
	9	40	19	47.5	53	24	45.3	62	18	29.0	155	61	39.4
17	6	38	17	44.7	36	19	52.8	23	10	43.5	97	46	47.4
	9	38	20	52.6	36	22	61.1	23	12	52.2	97	54	55.7
19	6	24	3	12.5	22	3	13.6	21	3	14.3	67	9	13.4
	9	24	10	41.7	22	11	50.0	21	7	33.3	67	28	41.8
合计	6	102	28	27.5	111	43	38.7	106	24	22.6	319	95	29.8
	9	102	49	48.0	111	57	51.4	106	37	34.9	319	14	144.8

表 3 不同脉宽电脉冲对激活卵发育力的影响

卵龄 (h)	脉宽 (μ s)	2-cell	3-cell	4-cell	8-cell	桑椹胚
15	160	—	1/24(4.2)	—	—	—
	320	—	—	2/31(6.5)	5/31(16.1)	1/31(3.2)
	640	—	—	—	2/29(6.9)	20/29(69.0)
17	160	4/20(20.2)	2/20(10.0)	1/20(5.0)	1/20(5.0)	10/20(50.0)
	320	11/21(52.4)	—	3/21(14.3)	1/21(4.8)	2/21(9.5)
	640	—	1/12(8.3)	—	3/12(25.0)	—
19	160	—	—	1/10(10.0)	—	—
	320	—	—	1/11(9.1)	3/11(27.3)	—
	640	—	—	—	—	—

注:分母表示活化卵数,分子表示活化卵发育到相应阶段的胚胎数,括号内数据表示胚胎数占活化卵数的百分率。

2.2 酒精刺激对卵母细胞活化的影响

2.2.1 酒精浓度对卵母细胞孤雌生殖的影响 从表 4 可以看出,在 1%~7%酒精组,随酒精浓度的升高,卵母细胞卵裂率增加($r=0.984, P<0.05$);在 7%~11%酒精组中,卵裂率呈现下降趋势($r=0.957$)。方差分析结果表明,7%和 9%酒精组与对照组(0%酒精组)相比,差异显著($P<0.05$),但 7%与 9%酒精组无统计差异,而 7%酒精组卵裂率及激活卵发育率较 9%组高,因此选用 7%酒精浓度做进一步实验。

表 4 酒精浓度对小鼠卵母细胞孤雌生殖的影响

酒精 浓度	卵母细 胞数(枚)	1PN	2PN	3PN	卵裂数 (枚)	卵裂率 (%)	2-Cell	4-Cell	8-Cell	桑椹胚
0	24	2	9	1	4	16.7	2	2	—	—
1	23	2	7	2	4	17.4	3	1	—	—
3	25	1	9	2	7	28.0	3	3	1	—
5	24	3	8	1	8	33.3	4	2	1	1
7	25	3	9	1	12	48.0	5	4	2	2
9	22	2	8	1	10	45.5	4	3	2	1
11	24	2	10	2	9	37.5	3	4	2	—

2.2.2 酒精刺激时间对卵母细胞孤雌生殖的影响 表 5 结果表明,用 7%酒精分别刺激卵母细胞 1,2,3,4 min,卵母细胞的活化率和体外发育率均与 0.5 min 组差异显著($P<0.05$),其中 2,4 min 组差异极显著($P<0.01$),但 2,4 min 组之间无差异。2 min 处理组桑椹胚发育率明显高于 4 min 组,因此,7%酒精刺激小鼠卵母细胞时间以 2 min 为最佳。

表5 酒精刺激时间对小鼠卵母细胞孤雌生殖的影响

刺激时间 (min)	卵母细胞数(枚)	1PN	2PN	3PN	卵裂数 (枚)	卵裂率 (%)	2-Cell	4-Cell	8-Cell	桑椹胚
0.5	23	3	5	2	6	26.1	3	3	—	—
1	24	2	12	1	11	45.8	5	3	2	1
2	25	2	11	1	18	72.0	7	6	1	4
3	24	2	8	1	12	50.0	5	4	2	1
4	25	1	9	2	14	56.0	6	5	3	1

3 讨论与结论

在受精过程中,哺乳动物卵母细胞经精子激活后,其胞质的游离钙浓度呈现多次规律性的脉冲升高^[3]。Zimmermann^[4]证明在瞬时高压电激下,细胞膜形成很多可以恢复的微小孔洞,电激活液中 Ca^{2+} 可以通过这些微小孔洞进入细胞中,使细胞内 Ca^{2+} 浓度呈脉冲性升高。Cuthbertson^[5]证明乙醇可以改变卵母细胞膜的稳定性,使钙库中 Ca^{2+} 释放出来以及增加细胞外 Ca^{2+} 渗入。象这样,能模拟正常受精过程 Ca^{2+} 节律性脉冲升高,就能复制出正常受精过程中一系列反应。

电刺激小鼠卵母细胞形成两个原核占激活卵的 61.8%,说明形成两原核是小鼠卵母细胞电激活的主要表现。乙醇激活的卵母细胞大部分排出第二极体,形成单倍体胚胎^[2],为防止单倍体的形成,本实验用细胞松弛素 B 来抑制第二极体的排出,结果表明活化卵以形成二原核为主。

在电激活实验中,以场强 55 V/mm,脉宽分别为 160,320 和 640 μs 的一个电脉冲对卵龄 15,17,19 h 的小鼠卵母细胞刺激活化率差异不显著($P>0.05$)。这个结果与谭景和^[6]在 0.45 kV/cm 场强下,持续 160,320,640 μs 的电脉冲,对不同卵龄小鼠卵母细胞活化率差异不显著的结论基本一致。

Hogan^[6]证明小鼠卵母细胞受精后 3~6 h 排出第二极体和形成原核,谭景和^[7]认为小鼠卵母细胞活化刺激后培养 5~6 h 观察活化情况。据此,本实验比较了小鼠卵母细胞进行电刺激后培养 6 和 9 h 的活化情况,结果表明经过不同电刺激的卵母细胞,培养 9 h 总活化率较 6 h 总活化率高 15%。

虽然,在 55 V/mm 场强下,脉宽分别为 160,320,640 μs 的电脉冲对不同卵龄小鼠卵母细胞活化率差异不显著,但是,对形成两原核占激活卵的百分率及激活卵发育能力进行综合分析,则脉宽 640 μs 、场强 55V/mm 的一个电脉冲对卵龄 15 h 小鼠卵母细胞进行刺激,激活效果较为理想。

用不同的酒精浓度刺激卵龄 15 h 的小鼠卵母细胞 1 min,结果表明 7%和 9%的酒精浓度处理卵母细胞其活化率显著高于对照组($P<0.05$),而 7%酒精组较 9%酒精组的活化率及激活卵发育能力略高。用 7%酒精浓度刺激 2 min,小鼠卵母细胞活化效果、体外发育能力最好。

参 考 文 献

- 1 Kaufman M H. Early mammalian development, parthenogenetic studies. Cambridge: Cambridge University Press, 1983
- 2 岳占瑾, 程怀江. 畜禽孤雌生殖研究进展. 国外畜牧科技, 1994, 21(1): 8~11
- 3 Cuthbertson K S R, Whittingham D G, Cobbold P H. Free Ca^{2+} increase in exponential phases during mouse oocytes activation. Nature, 1981, 294: 754~757
- 4 Zimmermann U, Vienken J A. Electric field induced cell to cell to cell fusion. J Membrane Biol, 1982, 67: 165~182
- 5 谭景和, 杨辉云, 周琪等. 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. 细胞生物学杂志, 1994, 16(1): 42~44
- 6 Hogan B. Manipulating the Mouse Embryo (A laboratory Manual). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986, 107~108
- 7 谭景和, 秦鹏春, 马 骥. 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. 细胞生物学杂志, 1988, 10(1): 69~72

Parthenogenetic Activation of Mouse Oocytes and in Vitro Development

Kou Quan'an Li Yuqing Zhang Meijia Zhang Yong

(Department of Veterinary Medicine, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract In this paper, mouse oocytes with different ages were stimulated by different electrical pulses and alcoholic concentrations and cultured in vitro. And their activation and development were observed. The results were as follows: ① the oocytes of 17 h of age stimulated by electrical pulse with the duration of 160 μ s, field strength of 55 V/mm formed 2 pronucleus with the activated oocyte rate of 90%, while the oocytes of 15 h of age stimulated by electrical pulse with the duration of 640 μ s, field strength of 55 V/mm could have the rate of the morulas development reach 69%; ② stimulated by 7% alcoholic concentration for 2 minutes, the activation rate of 15 h oocytes was 72% and the rate of the morulas development was 22. 2%.

Key words oocyte, electrical pulse, ethanol, parthenogenesis, mouse