

乙醇和电场激活小鼠早期卵母细胞的研究

李裕强 张 涌 王新庄

(西北农业大学动物科学与动物医学学院, 陕西杨凌 712100)

摘 要 分别用 $70 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙醇 2 min 和 $55 \text{ V} \cdot \text{mm}^{-1}$ 电场 $640 \mu\text{s}$ 一次脉冲, 对注射 hCG 15 h 的小鼠卵母细胞作激活处理。结果表明: 虽然乙醇处理的活化率 (55.40%) 略高于电刺激 (46.90%), 但二者没有显著差异; 与乙醇比较, 电激活的卵母细胞能保持良好的发育能力, 二者的桑椹胚发育率分别为 31.51% 和 91.37%, 差异极显著 ($P < 0.01$), 说明电场作用后卵母细胞的活动更符合其正常的活化规律。

关键词 卵母细胞, 孤雌发育, 小鼠

分类号 S823.36, S814.6

自然情况下, 哺乳动物的成熟卵母细胞 (MII 期) 在受精时由精子活化, 排出第二极体, 完成第二次成熟分裂并过渡到第一次卵裂间期。一些理化因素也可使有性生殖的卵母细胞活化而启动由卵母细胞自身控制的孤雌发育。小鼠的孤雌发育胚可以着床, 发育至上肢芽期^[1]。 $70 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙醇处理 2 min 和 $55 \text{ V} \cdot \text{mm}^{-1}$ 电场 $640 \mu\text{s}$ 一次脉冲均是激活小鼠卵母细胞的有效方式^[2]。小鼠卵母细胞的活化率随卵龄的增加而增加^[3], 因此人们多选择晚期 (18~19 h) 小鼠卵母细胞作孤雌发育的研究。但是, 卵母细胞获得受精子刺激活化能力的时间要早于获得受乙醇刺激活化能力的时间^[4], 表明早期卵母细胞的活化更接近于自然发育特性。那么, 乙醇和电刺激两种常用的激活手段, 哪种能更有效地使早期小鼠卵母细胞活化并发育呢? 为此, 本试验选用早期时龄 (15 h) 的小鼠卵母细胞, 分别经这两种方式处理后, 观察其活化效率的差异。

1 材料与方法

卵母细胞 选用 6~8 周龄昆明小白鼠 (20~25 g) 皮下注射 PMSC (天津实验动物中心, 960109) $133.36 \text{ nmol} \cdot \text{s}^{-1}$, 48 h 后皮下注射 hCG (宁波激素制品厂, 951207) $167.70 \text{ nmol} \cdot \text{s}^{-1}$, 采集 hCG 15 h 后的输卵管卵母细胞^[2]。

乙醇激活 将卵母细胞置 $70 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 无水乙醇的 PBS (自配) 中 2 min 后, M199 (GibcoBRL) 清洗 3 次, 再置于含 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 细胞松弛素 B (Sigma) 的 M199 中, 37°C 、 $50 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1} \text{CO}_2$, 饱和湿度下培养 3 h 后, M199 中继续培养。

电场激活 卵母细胞在激活液 ($0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇, $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{MgCl}_2$, $0.05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCl}_2$) 平衡 3 min 后, 置电激活槽中, 给一次 $55 \text{ V} \cdot \text{mm}^{-1}$, $640 \mu\text{s}$ 电脉冲, M199 液中培养。

收稿日期 1998-03-13

课题来源 国家自然科学基金资助项目, 39570526

作者简介 李裕强, 男, 1969 年生, 助理研究员

活化观察 培养 6 h后,观察原核形成(活化)及发育情况。

2 结 果

2.1 乙醇和电刺激的活化效果比较

早期小鼠卵母细胞(15 h)经乙醇或电刺激后的激活率都较低。相对而言,乙醇处理组的原核(PN)形成率(51.46%)略高于电刺激组(46.91%),但两组之间没有显著性差异($P>0.05$),见表1。

表 1 乙醇、电场对小鼠卵母细胞的活化效果

处理方式	处理数/枚	活化数/枚				活化率/%	2PN率/%
		1PN	2PN	3PN	总活化数		
乙醇	171	22	62	4	88	51.46 a	70.45
电场	162	21	55	0	76	46.91 a	72.37

2.2 活化卵母细胞的二倍体比率

由表1还可看出,无论是乙醇配合细胞松弛素处理,还是电场作用,所激活的卵母细胞中形成两个原核者(2PN)占大多数,分别为70.45%和72.37%,即以形成二倍体为主要方向。经两种处理后,均有一定比例的单倍体形成。在乙醇处理组,还可观察到少数多原核卵出现,电刺激组则无此现象。

2.3 卵母细胞活化后的发育能力比较

15 h的小鼠卵母细胞经乙醇、电刺激后的卵裂率和激活卵母细胞的发育能力见表2。

表 2 乙醇、电场激活卵母细胞的发育能力比较

处理方式	处理数/枚	卵裂数/枚	卵裂率/%	发育能力		
				4-Cell数/枚	8-Cell数/枚	桑椹胚数/枚
乙醇	171	73	42.69	33	26	23
电场	162	58	35.80	54	53	53

乙醇配合细胞松弛素B处理15 h小鼠卵母细胞能得到高于电刺激的第一次卵裂率,但其中不能进行第二次分裂的超过一半,发育至桑椹胚的仅占总分裂数的31.51%(23/73)。电刺激后发生卵裂者有91.37%(53/58)发育到桑椹胚期,二者差异极显著($P<0.01$),表明电激活卵子的继续发育能力显著优于乙醇激活卵。

2.4 二倍体与发育能力的关系

综合表1、表2的数据还可看出,两种方式刺激卵母细胞后,发生第一次卵裂的数目都低于形成原核的数目,活化卵中有近1成没有分裂能力。但能进行第二次卵裂,形成4-细胞期胚的均为二倍体。电激活卵子中,55枚含2PN的卵,有53枚稳定地发育至桑椹胚期,达96.36%,而同一指标在乙醇处理组为37.10%(23/62),二者差异极显著($P<0.01$)。

3 讨 论

乙醇配合细胞松弛素处理和电场作用是激活哺乳动物卵母细胞的主要方式。卵子的活化率与卵龄、所用方式的各项参数等因素有关^[3]。对15 h的小鼠卵母细胞采用

70 mL⁻¹乙醇处理 2 min 或 55 V[·]mm⁻¹, 640 μs 电场一次电脉冲刺激的效果最佳^[2]。本实验比较了这两种方式处理后,小鼠早期卵母细胞的活化率与发育能力之间的差异。结果表明,就形成原核率和第一次卵裂率而言,乙醇处理组高于电刺激组,但从卵母细胞的后续发育能力来看,电刺激的效果明显优于乙醇处理。在发生第一次卵裂后,电刺激组能较稳定地发育至桑椹胚期(91.37%);用乙醇处理后,大部分(54.66%)失去进行第二次卵裂的能力,桑椹胚发育率仅为 31.51%。

在卵母细胞的活化过程中,细胞内 Ca^{2+} 节律性地脉冲升高起关键的介导作用^[5,6]。卵子胞质 Ca^{2+} 升高可使 MPF(Maturation promoting factor)和 CSF(Cytostatic factor)失活或消失,从而启动成熟分裂器,促使 MII 期卵继续第二次成熟分裂^[7]。MPF 是一种蛋白激酶,在卵母细胞的减数分裂过程中起关键的调控作用,可推动细胞进入 MII 期,并在 MII 期维持高的活性状态,在 MII 的中后期活性迅速下降直至消失,卵母细胞活化,完成第二次成熟分裂。原癌基因 *c-mos* 的产物 CSF 调控 MPF 活性的维持与降解。CSF 能使 MPF 的调节亚基 cyclin B 磷酸化,产生有活性的 MPF。在卵受精激活恢复分裂时,CSF 活性消失, cyclin B 被降解, MPF 失活,细胞离开 MII 期。在受精过程中,精卵的接触启动卵子的信号传导系统,通过磷酸肌醇(InsP_3)诱导钙释放(ICR)^[8]和钙诱导钙释放(CICR)^[6]两种机制的协调作用而使胞质 Ca^{2+} 脉冲性升高导致卵子活化。乙醇和电刺激诱发卵活化的途径不同^[9]。乙醇处理可改变膜的稳定性,使钙库的 Ca^{2+} 释放,同时增加胞外钙的内流,因而有充足的胞质 Ca^{2+} 浓度使较多的卵子活化;但这种对膜性质的改变,可能会影响其继续发育的能力。细胞松弛素 B 能抑制第二极体排出,提高形成二倍体的比例。少数多原核卵的出现,似乎表明它会引起卵母细胞的一些异常反应,即使形成 2PN,其发育能力也较差。用电刺激时,由于瞬时高电压的作用,使细胞膜形成很多可恢复的小孔洞,介质中的 Ca^{2+} 可通过这些微小孔洞进入胞质,使胞内 Ca^{2+} 脉冲升高,而使卵活化。在试验中,电刺激组的活化率较低,可能主要是卵龄较小的缘故,因为早期卵母细胞对电刺激的反应较差^[3]。电激活卵很少排出第二极体,自然形成二倍体,表明电刺激对卵子正常生理活动的负面影响较小,一旦被活化,则能维持较高的发育能力。

卵母细胞激活后形成二倍体者发育较正常^[9],本试验结果也可看出这一点,用乙醇处理后,第一次卵裂数高于形成 2PN 数(73:62),但能进行第二次卵裂的只能是形成 2PN 者;电刺激后,能稳定的发育至桑椹胚的也只是那些含有两个原核的卵母细胞。

参 考 文 献

- 1 Kaufman M H, Barton S C, Surani M Z H. Normal postimplantation development of mouse parthenogenetic embryos to morula stage. *Nature*, 1977, 265: 53~55
- 2 寇全安,李裕强,张美佳,等.小鼠卵母细胞的孤雌激活及体外发育.西北农业大学学报,1997,25(3): 82~86
- 3 谭景和,杨婵云,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: 42~44
- 4 Kubiak J Z. Mouse oocytes gradually develop the capacity for activation during the metaphase II arrest. *Dev Biol*, 1989, 136: 537~545
- 5 Stice S, James M R. Activation of mammalian oocytes by a factor obtained from rabbit sperm. *Mol Reprod Dev*, 1990, 25: 272~280

- 6 Swann K. A cytosolic sperm factor stimulates repetitive calcium increases and mimics fertilization in hamster eggs. *Development*, 1990, 110: 1295~ 1302
- 7 Kline D. Calcium-dependent events at fertilization of the frog egg: injection of a calcium buffer blocks in channel opening, exocytosis, and formation of pronuclei. *Dev Biol*, 1988, 126: 346~ 361
- 8 Dupont G, Berridge M J, Goldbeter A. Signal-induced Ca^{2+} oscillations: properties of a model based on Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release. *Cell Calcium*, 1991, 12: 73~ 85
- 9 邓满齐, 范必勤. 小鼠卵激活过程中胞质游离 Ca^{2+} 的变化及孤雌发育研究. *实验生物学报*, 1994, 27: 289~ 295

Activation of the Early Mouse Oocytes by Alcohol and Electricity

Li Yuqiang Zhang Yong Wang Xinzhuang

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Northwestern
Agricultural University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract The different responses of early mouse oocytes to alcoholic and electrical treatment were investigated in this study. Mouse oocytes, collected from superovulated mouse 15 h after hCG injection, were stimulated by $70 \text{ mL}^{-1} \text{ L}^{-1}$ alcohol (in PBS) 2 min or a $55 \text{ V} \cdot \text{mm}^{-1} \cdot 640 \mu\text{s}$ electrical pulse respectively. The results showed that, there were 55.40% oocytes activated after alcohol treatment, and the same number was 46.90% in electric stimulated oocytes. They had no significant differences ($P > 0.05$). Many activated oocytes include two pronuclear, and those oocytes with two PN develop much better. In the level of morulae rate, it can be found that electric stimulation can cause higher development ability than alcohol (91.37% : 31.51%, $P < 0.01$). The results suggest that electric stimulation be a more efficient method to activate early mouse oocytes. The possible reasons were also discussed.

Key words oocyte, activation, mouse