

不同因素对小鼠卵母细胞电激活 及孤雌发育的影响^{*}

马利兵¹, 王 强¹, 王凤梅², 张 涌¹

(1 西北农林科技大学 生物工程研究所, 陕西 杨凌 712100;

2 包头市农牧学校, 内蒙古 包头 014100)

[摘 要] 研究了卵龄、电脉冲参数、氯化锶、亚胺环己酮(CHX)对小鼠卵母细胞电激活及孤雌发育效果的影响。结果表明, 卵龄为 17 h 的小鼠卵母细胞在场强 1.0 kV/cm, 脉冲宽度 30 μ s, 2 次电脉冲, 激活液中含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Sr^{2+} 的条件下激活后, 再于含 CHX 的培养液中培养, 可较好地激活卵母细胞, 提高体外孤雌胚的发育率, 激活率及桑囊胚率分别可达 83.3% 和 57.5%。

[关键词] 小鼠; 卵母细胞; 电激活; 氯化锶; 亚胺环己酮

[中图分类号] Q 945.43⁺ 2; S865.1⁺ 30.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2004)10-0066-05

进行卵母细胞激活是细胞核移植的关键技术环节之一, 其活化效率直接影响核移植的成功率。休止于第二次减数分裂中期(M II)的卵母细胞, 可以通过多种物理和化学因素, 如温度、电刺激、渗透压、酶及钙离子载体 A 23187 等而被激活, 目前普遍采用的有化学激活法和电脉冲法。电脉冲法由于操作简单, 物理参数可以精确固定, 重复性好且细胞在激活液中停留时间短, 及有利于细胞存活等诸多优点而被广泛采用。然而, 由于动物种类、选用仪器、激活液及培养条件不同, 所得结果也不尽相同。本研究拟以小鼠为动物模型, 寻求卵母细胞的最佳电激活条件, 为其他动物的相关研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

昆明小鼠购于第四军医大学实验动物中心, 孕马血清促性腺激素(PMSG)和人绒毛膜促性腺激素(HCG)购于天津实验动物中心, 其余药品和试剂均购于 Sigma 公司。电融合仪为日本 SHIMADZU 生产的 SSH-2 电融合仪。

1.2 卵母细胞的采集

对 8~12 周龄的昆明小鼠进行超排处理, 每只腹腔注射 PMSG 10 IU, 间隔 48 h 后腹腔再注射

HCG 10 IU。分别于注射后 13, 15, 17, 19 h 用颈部脱臼法处死小鼠, 无菌法采取输卵管于 PBS 液中, 撕开膨大部使卵丘-卵母细胞复合体(Cumulus-enclosed Oocyte Complexes)流出, 将卵丘团移入含 2 g/L 透明质酸酶的 PBS 液中作用 3~5 min, 去掉卵丘细胞, 在 PBS 液中洗涤 3~5 次, 待用。

1.3 卵母细胞的电激活和体外培养

电激活前, 将卵母细胞在电激活液中平衡 2~4 min, 然后注入含激活液的融合槽内, 施以不同条件的电脉冲, 电激活后的卵母细胞移入培养液中洗涤 3~5 次, 然后置于上覆石蜡油的培养液微滴中进行微滴培养(体积分数 5% CO_2 , 37 $^{\circ}\text{C}$, 饱和湿度)。电激活液为含或不含 0.1 mmol/L CaCl_2 , 0.1 mmol/L MgSO_4 及 10 mmol/L SrCl_2 的 0.3 mol/L 甘露醇溶液; 培养液为含或不含亚胺环己酮(cycloheximide, CHX)的培养液。

1.4 活化检查

电激活处理后 6 h, 用光学显微镜检查卵母细胞激活情况, 出现 1 原核 1 极体、1 原核 2 极体、2 原核 1 极体或卵裂的卵母细胞判断为活化, 进而统计体外发育的卵裂率及囊胚发育率。

1.5 试验数据处理

利用 t 检验及方差分析对数据作统计学分析。

^{*} [收稿日期] 2003-09-09

[基金项目] 国家“863”高技术研究发展计划项目(2001AA 213081)

[作者简介] 马利兵(1973-), 男, 内蒙古包头市人, 在读硕士, 主要从事哺乳动物体细胞核移植研究。

2 结果与分析

2.1 卵母细胞卵龄对激活的影响

脉冲强度 1.0 kV/cm, 脉冲宽度 30 μ s, 2 次脉冲, 间隔时间 1 min, 激活液为含 Ca^{2+} , Mg^{2+} 的甘露醇溶液, 激活结果见表 1。由表 1 可以看出, 在同等

条件下, 随着卵龄(HCG 注射后的时间)的增加, 卵母细胞的激活率升高。但卵龄大于 17 h 后, 激活率上升缓慢, 而裂解率上升显著($P < 0.05$), 且卵裂率及桑囊胚率显著下降($P < 0.05$)。因此, 以卵龄为 17 h 的小鼠卵母细胞激活效果最好。

表 1 卵龄对小鼠卵母细胞电激活及孤雌发育的影响

Table 1 Effects of age on the electroactivation and parthenogenesis of mouse oocytes

卵龄/h Age	处理数 No. treated	激活率/% No. activated	发育阶段/% Developmental stage		裂解率/% No. cleaved
			2-细胞 2-cell	桑囊胚率 M/B	
13	60	48.3(29)a	82.8(24)a	37.9(11)a	0(0)a
15	49	61.2(30)b	83.3(25)a	33.3(10)a	0(0)a
17	52	73.1(38)c	81.6(31)a	34.2(13)a	3.8(2)a
19	70	74.3(52)c	73.1(38)b	26.9(14)b	5.7(4)b

注(Notes): a, b, b: c, $P < 0.05$; a: c, $P < 0.01$

2.2 脉冲强度对卵母细胞激活及孤雌发育的影响

卵龄 17 h, 脉冲宽度 30 μ s, 2 次脉冲, 间隔时间为 1 min, 不同脉冲强度下卵母细胞激活结果见表 2。从表 2 可以看出, 不同脉冲强度下, 卵母细胞的激活率和裂解率存在显著差异($P < 0.05$)。随脉冲强度的增加, 激活率上升到某一峰值(1.0 kV/cm,

73.1%)后, 如果进一步提高脉冲强度, 则激活率反而下降, 同时卵裂率及桑囊胚率也开始下降($P < 0.05$), 而裂解率则随脉冲强度的增加而上升。可见, 过高的脉冲强度不仅不能提高卵母细胞的激活率, 反而对卵母细胞具有损伤作用, 因此脉冲强度以 1.0 kV/cm 较理想。

表 2 脉冲强度对小鼠卵母细胞激活及孤雌发育的影响

Table 2 Effects of field strength on the electroactivation and parthenogenesis of mouse oocytes

脉冲强度/ (kV $\cdot$ cm ⁻¹) Field strength	处理数 No. treated	激活率/% No. activated	发育阶段/% Developmental stage		裂解率/% No. cleaved
			2-细胞 2-cell	桑囊胚率 M/B	
0.8	30	66.7(20)b	80.0(16)a	35.0(7)a	0(0)a
1.0	52	73.1(38)a	81.6(31)a	34.2(13)a	3.8(2)a
1.2	35	68.6(24)ab	79.2(19)a	33.3(8)a	8.6(3)b
1.4	40	65.0(26)b	73.1(19)ab	26.9(7)b	12.5(4)bc
1.6	39	51.2(20)c	65.0(13)b	20.0(4)b	15.4(5)c

注(Notes): a, b, b: c, $P < 0.05$; a: c, $P < 0.01$

2.3 脉冲宽度对卵母细胞激活及孤雌发育的影响

卵龄 17 h, 脉冲强度 1.0 kV/cm, 2 次脉冲, 间隔时间 1 min, 不同脉冲宽度下, 卵母细胞激活及孤雌发育的情况见表 3。由表 3 可知, 脉冲宽度为 30 μ s 时的激活率为 73.1%, 明显高于其他组($P < 0.05$), 卵裂率及桑囊胚率也高于其他组。在 10 μ s 的脉冲宽度下, 无法激活卵母细胞, 说明脉冲宽度太

短, 几乎不能使细胞膜上生成可逆性的微孔。在 50 μ s 的脉冲宽度下, 激活率仅为 49.1%, 而裂解率明显上升($P < 0.01$)。说明超过一定的范围, 再提高脉冲宽度, 不仅不能提高卵母细胞的激活率, 反而会引起细胞损伤, 使卵裂率及桑囊胚率显著下降($P < 0.05$)。

表 3 脉冲宽度对小鼠卵母细胞及孤雌发育的影响

Table 3 Effects of pulse duration on the electroactivation and parthenogenesis of mouse oocytes

脉冲宽度/ μ s Pulse duration	处理数 No. treated	激活率/% No. activated	发育阶段/% Developmental stage		裂解率/% No. cleaved
			2-细胞 2-cell	桑囊胚率 M/B	
10	39	0(0)a	0(0)a	0(0)a	0(0)c
20	42	59.5(25)b	76.0(19)c	8(32.0)c	2.4(1)c
30	52	73.1(38)c	81.6(31)c	34.2(13)c	3.8(2)c
40	49	65.3(32)b	81.3(26)c	28.1(9)bc	8.2(4)b
50	57	49.1(28)b	60.7(17)b	21.4(6)b	14.0(8)a

注(Notes): a, b, $P < 0.01$; b: c, $P < 0.05$

2.4 脉冲次数对卵母细胞激活及孤雌发育的影响

卵龄 17 h, 脉冲强度 1.0 kV/cm, 脉冲宽度 30 μ s, 分别给予 1 次、2 次和 3 次电脉冲, 脉冲间隔时间为 1 min, 激活及孤雌发育的结果见表 4。从表 4 可以看出, 2 次及 3 次电脉冲的激活率明显高于 1 次电脉冲 ($P < 0.01$), 说明多次脉冲有利于卵母细

胞的激活。但 3 次脉冲的裂解率显著高于 2 次脉冲 ($P < 0.01$), 同时囊胚率也低于 2 次脉冲 ($P < 0.01$)。说明多次脉冲虽然可以提高卵母细胞的激活率, 但对卵母细胞具有损伤作用, 导致裂解率上升, 囊胚率下降, 因此以 2 次脉冲为宜。

表 4 脉冲次数对小鼠卵母细胞激活及孤雌发育的影响

Table 4 Effects of pulse number on the electroactivation and parthenogenesis of mouse oocytes

脉冲次数 No. pulse	处理数 No. treated	激活率/% No. activated	发育阶段/% Developmental stage		裂解率/% No. cleaved
			2-细胞 2-cell	桑囊胚率 M/B	
1	48	58.3(28)a	78.6(22)a	32.4(9)a	0(0)a
2	52	73.1(38)b	81.6(31)a	34.2(13)a	3.8(2)a
3	50	74.0(37)b	61.0(25)b	29.2(12)b	20.0(10)b

注(Notes): a: b, $P < 0.01$ 。

2.5 激活液中 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 及 Sr^{2+} 对卵母细胞激活及孤雌发育的影响

在卵龄 17 h, 脉冲强度 1.0 kV/cm, 脉冲宽度 30 μ s, 2 次脉冲, 时间间隔为 1 min 的脉冲参数下,

分别在不含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Sr^{2+} , 仅含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} , 仅含 Sr^{2+} 及既含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 又含 Sr^{2+} 的激活液中进行电激活, Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 浓度为 0.1 mmol/L, Sr^{2+} 浓度为 10 mmol/L, 结果见表 5。

表 5 激活液中 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 及 Sr^{2+} 对卵母细胞激活及孤雌发育的影响Table 5 Effects of Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Sr^{2+} on the electroactivation and parthenogenesis of mouse oocytes

处理 Treatment	处理数 No. treated	激活率/% No. activated	发育阶段/% Developmental stage		裂解率/% No. cleaved
			2-细胞 2-cell	桑囊胚率 M/B	
无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Sr^{2+} No Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Sr^{2+}	32	0(0)a	0(0)a	0(0)a	0(0)
Ca^{2+} + Mg^{2+}	52	73.1(38)c	81.6(31)b	34.2(13)b	3.8(2)
Sr^{2+}	39	56.4(22)b	77.3(17)b	31.8(7)b	2.6(1)
Ca^{2+} + Mg^{2+} + Sr^{2+}	42	78.6(33)d	78.8(26)b	45.5(15)c	4.8(2)

注(Notes): a: b, $P < 0.01$; b: c, c: d, $P < 0.05$ 。

由表 5 可以看出, 激活液中不含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Sr^{2+} 时, 无法激活卵母细胞; 激活液中仅含 Sr^{2+} 时, 虽能激活卵母细胞, 但激活率低于含有 Ca^{2+} + Mg^{2+} 的激活液 ($P < 0.05$); 含有 Ca^{2+} + Mg^{2+} + Sr^{2+} 的激活液, 其激活率高于仅含 Ca^{2+} + Mg^{2+} 的激活液 ($P < 0.05$)。说明电激活液中 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 是卵母细胞能否激活的决定性成分。仅含 Sr^{2+} 的激活液不能使卵母细胞充分激活, 含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的激活液中添加适量 Sr^{2+} , 可进一步提高卵母细胞的激活率及桑囊胚率 ($P < 0.05$)。从孤雌胚的发育情况及裂

解率来看, 激活液中含有 Sr^{2+} 对孤雌胚的进一步发育影响不大。

2.6 CHX 对孤雌胚进一步发育的影响

卵龄 17 h, 在含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Sr^{2+} 的激活液中, 于脉冲强度 1.0 kV/cm, 脉冲宽度 30 μ s, 2 次脉冲, 间隔时间 1 min 条件下激活后, 分别置于含 CHX (10 μ g/mL) 及不含 CHX 的 CZB 培养液中, 孤雌胚的发育情况见表 6。从表 6 可以看出, 含 CHX 的培养液能提高卵母细胞的激活率、卵裂率 ($P < 0.05$) 及桑囊胚率 ($P < 0.01$)。

表 6 亚胺环己酮对小鼠卵母细胞电激活及孤雌发育的影响

Table 6 Effects of CHX in medium on the electroactivation and parthenogenesis of mouse oocytes

CHX 含量/ (μ g $\cdot$ mL $^{-1}$) CHX content	处理数 No. treated	激活率/% No. activated	发育阶段/% Developmental rate		裂解率/% No. cleaved
			2-细胞 2-cell	桑囊胚率 M/B	
0	42	78.6(33)a	78.8(26)a	45.5(15)a	4.8(2)
10	48	83.3(40)b	82.5(33)b	57.5(23)c	6.3(3)

注(Notes): a: b, $P < 0.05$; a: c, $P < 0.01$ 。

3 讨 论

电脉冲能激活卵母细胞是由于电脉冲使卵母细胞膜上生成了可逆的微孔, 引起胞质内 Ca^{2+} 浓度升高, 从而可激活卵母细胞^[1]。随着卵龄的增大, 卵对激活刺激的敏感性逐渐增加, 卵母细胞的激活率迅速提高, 而且卵子的过度老化会出现一定比例的自发激活(约有 8.6% 的小鼠卵母细胞发生自发激活^[2], 牛自发激活的比率高达 46%^[3])。本试验中, 小鼠卵母细胞随卵龄的增加, 激活率逐渐上升, 但在卵龄大于 17 h 后, 激活率的上升不明显, 而裂解率明显上升。同时, 孤雌胚发育至囊胚的比率开始下降, 可能由于卵龄过长使卵母细胞老化, 受到刺激后易引起损伤。所以卵龄为 17 h 的小鼠卵母细胞激活率及孤雌胚的发育情况最佳。电激活中脉冲强度大小与孔洞的生成有关, 若强度过大则会造成孔洞不可逆, 使细胞受到损伤导致活化率下降^[1]。从本试验中可以看出, 细胞膜上孔洞的生成不仅与脉冲强度有关, 而且与脉冲宽度有关, 脉冲强度或脉冲宽度低于某一数值, 都不能使卵母细胞激活, 但也不能太高, 否则将造成卵母细胞不可逆的损伤, 使激活率及孤雌胚的发育率下降。激活率与脉冲次数呈线性关系^[1, 4], 单次脉冲不足以引起卵母细胞激活所需的 Ca^{2+} 释放^[1, 5]。本试验中, 对小鼠卵母细胞施予 2 次或 3 次电脉冲的激活率明显高于 1 次电脉冲, 但 3 次电脉冲的裂解率明显高于 2 次电脉冲, 而孤雌胚的发育率却低于 2 次电脉冲, 说明多次电脉冲虽可较好地激活卵母细胞, 但也对卵母细胞具有损伤作用。在上述的卵龄、脉冲强度、脉冲宽度和脉冲次数 4 个参数中, 卵龄为卵母细胞能否激活的内因, 其他 3 个参数为外因。卵龄是卵母细胞激活的最重要因素, 可以不受其他 3 个参数的影响, 如卵龄过大, 可以发生自发激活, 其他 3 个参数通过卵龄而发挥作

用, 他们都必须处于各自的某一范围之内, 某一参数低于或高于其范围, 不能通过另 2 个参数的提高或降低得以补偿。当 3 个参数都处于其范围之内时, 他们之间可能存在某种相关性, 某一参数的降低可通过另 2 个参数的提高而得到补偿。他们之间的相关关系还有待进一步研究。

哺乳动物卵母细胞 M II 期的维持与高水平的成熟促进因子(MPF)有关。激活刺激使卵母细胞内游离 Ca^{2+} 水平升高, 继而引起细胞内 cyclin B 减少, 导致 MPF 水平下降或消失, 引起卵子激活。电刺激介导的卵游离 Ca^{2+} 升高主要来源于细胞外 Ca^{2+} 内流^[6], 电刺激后再结合 SrCl_2 处理可明显促进卵母细胞的活化。可能是由于在瞬时的高场强刺激后, 卵母细胞膜上形成了很多可逆的微孔, 使外源 Ca^{2+} 能进入卵胞质, 增加了胞质内的游离 Ca^{2+} ^[7], 而随后 Sr^{2+} 的继续进入, 能诱导内源 Ca^{2+} 释放, 进一步增加胞质内 Ca^{2+} 的浓度, 从而更好地激活卵母细胞, 有利于随后的发育^[8]。本试验中, 不含 Ca^{2+} , Mg^{2+} 和 Sr^{2+} 的激活液不能使卵母细胞电激活。仅含 Sr^{2+} 的激活液虽可使卵母细胞激活, 但激活率明显低于含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的激活液。同时含有 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Sr^{2+} 的激活液与仅含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的激活液相比, 激活率及孤雌胚的发育率均高于后者, 这可能是由于电脉冲中大量 Sr^{2+} 进入卵胞质, 诱导了内源 Ca^{2+} 的释放, 从而进一步激活了卵母细胞。

CHX 是一种蛋白质合成抑制剂, 通过作用 80 s 的核糖体抑制肽链的移动, 从而抑制蛋白质的合成。在含有 CHX 的培养液中培养电激活后的卵母细胞, 可进一步抑制新的相关蛋白质的合成, 使 MPF 一直处于低水平, 从而促进卵母细胞的激活^[9]。本试验中, 电激活后的小鼠卵母细胞在含 CHX 的培养液中的激活率明显高于不含 CHX 的培养液, 且 CHX 对于孤雌胚的进一步发育也是有利的。

[参考文献]

- [1] 赵浩斌, 陈乃清, 魏庆信. 猪卵母细胞的电激活[J]. 西北农业学报, 1998, 8(1): 15- 19
- [2] 刘红林, 李朝军, 范必勤, 等. 小鼠体内和离体输卵管内卵母细胞的乙醇激活[J]. 农业生物技术学报, 1995, (3): 77- 80
- [3] King W A, Xu X P, Sirard M A, et al. Cytogenetic study of parthenogenetically activated bovine oocytes matured *in vivo* and *in vitro*[J]. Gamete Res, 1988, 20: 265- 274
- [4] Collas P, Balsie J J, Hofman G A, et al. Electrically activation of mouse oocytes[J]. Theriogenology, 1989, 32: 835- 844
- [5] Collas P, Fissore R A, Robl J M, et al. Electrically induced calcium elevation, activation and parthenogenetic development of bovine oocytes[J]. Mol Reprod Dev, 1993, 34: 212- 223
- [6] 邓满齐, 刘永民, 范必勤. 小鼠卵孤雌激活过程中细胞内游离 Ca^{2+} 的变化[J]. 南京大学学报, 1995, 31(2): 265- 271
- [7] 陈大元. 受精生物学——受精机制与生殖工程[M]. 北京: 科学出版社, 2000. 252- 264

- [8] 雷 蕾, 刘忠华, 寇朝辉, 等. 不同活化方法对小鼠卵母细胞孤雌发育的影响[J]. 实验生物学报, 2002, 35(3): 236- 238
- [9] 李光鹏, 孟庆刚, 魏 鹏, 等. 亚胺环己酮对猪卵母细胞人工孤雌激活作用的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2001, 32(5): 416- 420

Effects of different factor on electroactivation and parthenogenesis of mouse oocytes

MA Li-bing¹, WANG Qiang¹, WANG Feng-mei², ZHANG Yong¹

(1 Institute of Biological Engineering, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Baotou Agriculture-Husbandry School, Baotou, Inner Mongolian 014100, China)

Abstract: This study was designed to evaluate the effect of age, electric pulse parameter, SrCl₂, cycloheximide (CHX) on electroactivation and parthenogenesis of mouse oocytes. The results showed that mouse oocytes which were cultured in CHX-contained CZB medium *in vitro* after electric activation could obtain higher activated percentage and developmental percentage. Oocytes came from mouse 17 hours after being injected with HCG. Medium of activation contained Ca²⁺, Mg²⁺ and Sr²⁺. The condition of electroactivation was field strength 1.0 kV/cm, pulse duration 30 μs, two times pulses. The percentage of activation and morulae/blastocysts could reach 83.3% and 57.5% respectively.

Key words: mouse; oocytes; electroactivation; SrCl₂ cycloheximide

(上接第 65 页)

Effects of dietary L-carnitine on growth and metabolism of crucian

WANG Li-xin¹, ZHOU Ji-shu¹, YANG Yuan-hao², WANG Hui¹, WANG Tao¹

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Fisheries Research Institute of Shaanxi Province, Xi'an, Shaanxi 710086, China)

Abstract: Two hundred crucians, with mean weight 25.1 gram, were divided into five groups according to the level of dietary L-carnitine to investigate the effects on growth ratio, feed efficiency and metabolism. The results showed that the relative growth ratio and feed efficiency were improved markedly when crucian feed were added with 50-100 mg/kg L-carnitine, especially added with 100 mg/kg L-carnitine in crucian feed, the relative growth ratio and feed efficiency were best, improved 112.2% and 91.3% respectively ($P < 0.05$), compared with the control. At the same time the oxygen consumption of the crucian was tip top and the vigor of the crucian was best.

Key words: L-carnitine; crucian; relative growth ratio; metabolism degree