

尿嘧啶、三价因子和ATP对牛卵母细胞体外成熟的影响*

王洪锋, 王晓磊, 于海生, 雷安民, 贾文文, 黄伟伟, 窦忠英

(西北农林科技大学 国家干细胞工程技术研究中心陕西分中心, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 研究了尿嘧啶、三价因子和三磷酸腺苷二钠盐(ATP)对牛卵母细胞体外成熟及后期发育的影响。结果表明, 培养液中添加尿嘧啶和三价因子能够促进颗粒细胞的增殖, 提高牛卵母细胞的成熟率、卵裂率及8~16细胞率; ATP对牛卵母细胞成熟率影响不大, 但能提高孤雌激活胚胎发育能力。

[关键词] 牛卵母细胞; 线粒体; 尿嘧啶; 三价因子; ATP

[中图分类号] Q813.1⁺1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)06-0021-04

哺乳动物卵母细胞胞核及胞质的成熟是一个有序的过程, 其中涉及到染色体及细胞器的重新排布^[1-2]。在牛卵母细胞体外成熟培养过程中, 培养液的激素浓度和能量供应对线粒体重新排布有很重要的影响。这种重排对于卵母细胞完成减数分裂和后期发育有重要作用。Thompson等^[3]认为线粒体的成熟、重分布, 三磷酸腺苷二钠盐(ATP)的产生及能量的蓄积对卵母细胞的成熟、受精和分裂至关重要。目前, 用体外成熟(*in vitro* maturation, VM)的牛卵母细胞生产牛胚胎已经程序化^[4], 但对卵母细胞VM机理仍有待深入研究。本研究探讨了尿嘧啶(Uracil)、三价因子(insulin, transferrin and selenium, ITS)和ATP对牛卵母细胞成熟及孤雌激活胚胎发育的影响, 为牛卵母细胞VM线粒体的研究提供了基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

牛卵巢 牛卵巢采自西安某屠宰场, 置于含青霉素(60 mg/L)和链霉素(100 mg/L)的20~25生理盐水中, 4 h内运回实验室。

主要试剂 TCM-199、胎牛血清(FBS)为Gibco公司生产; 雌激素($17\beta E_2$)、尿嘧啶(Uracil)、ITS、ATP、离子霉素(ionomycin)、6-二甲氨基嘌呤(6-DMA P)为Sigma公司生产; 丙酮酸钠为Serva

公司生产; 人尿促性激素(hMG)为丽珠公司生产; 表皮生长因子(EGF)为R & D公司生产; JC-1为Fluka公司生产; 新生牛血清(NBS)为本实验室自制。

1.2 溶液配制

洗卵液: TCM-199+ 体积分数5% NBS+ 60 mg/L 青霉素+ 100 mg/L 链霉素;

对照组成熟液: TCM-199+ 体积分数10% FBS+ $2.5 \mu\text{g/mL}$ 丙酮酸钠+ 0.1 IU/mL hMG+ $1 \mu\text{g/mL}$ E_2 + 10 ng/mL EGF+ 60 mg/L 青霉素+ 100 mg/L 链霉素;

第一组成熟液: 对照组成熟液+ $50 \mu\text{g/mL}$ Uracil+ $10 \mu\text{L/mL}$ ITS;

第二组成熟液: 对照组成熟液+ 0.67 mg/mL ATP;

对照组培养液: TCM-199+ 体积分数10% FBS+ $2.5 \mu\text{g/mL}$ 丙酮酸钠+ 60 mg/L 青霉素+ 100 mg/L 链霉素;

第一组培养液: 对照组培养液+ $50 \mu\text{g/mL}$ Uracil+ $10 \mu\text{L/mL}$ ITS;

第二组培养液: 对照组培养液+ 0.67 mg/mL ATP;

激活液A: TCM-199+ 体积分数10% FBS+ $5 \mu\text{mol/L}$ 离子霉素;

激活液B: TCM-199+ 体积分数10% FBS+

* [收稿日期] 2005-12-30

[基金项目] 国家“863”计划项目(2002AA216161); 教育部重大科技专项(03160); 国家自然科学基金项目(30200137)

[作者简介] 王洪锋(1979-), 男, 吉林通化人, 在读硕士, 主要从事克隆及胚胎干细胞研究。

[通讯作者] 窦忠英(1939-), 男, 陕西兴平人, 教授, 博士生导师, 主要从事哺乳动物胚胎工程和干细胞工程研究。E-mail: douzhongying@china.com

2.5 mmol/L 6-DMAP;

JC-1 染色液: TCM-199 + 体积分数 10% NBS + 2 μ mol/L JC-1。

1.3 试验分组

试验分为 I、II 和 III 3 组, I、II 组为试验组, III 组为对照组, I 组所用成熟液和培养液分别为第一组成熟液及第一组培养液; II 组为第二组成熟液及第二组培养液; III 组为对照组成熟液及对照组培养液。所有试验均设 3 次以上重复。

1.4 牛卵母细胞的体外成熟

先将含有 3 组成熟液的四孔板(500 μ L/孔)在 38.5℃、体积分数 5% CO₂ 饱和湿度培养箱中平衡至少 2 h。用 12 号针头抽吸直径为 2~8 mm 的卵泡, 将吸出液收集在 15 mL 离心管中, 静置 5 min 后, 弃去上清液, 再用洗卵液洗 3 次。体视显微镜下挑选胞质均匀、并有 3 层以上卵丘细胞紧密包围的卵丘细胞-卵母细胞复合体(Cumulus-Oocyte Complexes, COCs), 将其随机分配到 3 组成熟培养液中培养 22~24 h, 统计卵母细胞数和颗粒细胞完全扩散的卵母细胞数, 计算颗粒细胞完全扩散的卵母细胞率。卵母细胞成熟培养后, 将培养的 COCs 移入 3 g/L 透明质酸酶溶液中作用 5 min, 用吸管反复吹打去除卵母细胞外周的颗粒细胞。用对照组培养液洗 3 次, 在体视显微镜下统计具有第一极体的卵母细胞数, 计算各组卵母细胞的成熟率。

1.5 牛卵母细胞的孤雌激活

将 3 组卵母细胞在激活液 A 中避光激活 5 min, 用同组培养液洗 3 遍; 再用激活液 B 在 38.5℃、体积分数 5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养 4~6 h, 之后用同组培养液将卵母细胞洗 3 遍, 然后分别用添加有 3 组培养液的四孔板(500 μ L/孔)培养, 激

活 48 h 后半量换液, 观察记录卵裂率及 8 细胞率。

1.6 牛卵母细胞 JC-1 染色

分别取成熟前及成熟后的卵母细胞, 用 JC-1 染色液染色 1 h, 在荧光显微镜下统计各组有荧光的卵母细胞数。

2 结果与分析

2.1 U racil, ITS 和 ATP 对颗粒细胞增殖的影响

试验所获得的 COCs 含有 3 层以上的颗粒细胞(图 1A), 经过 22 h 的成熟培养后, 部分 COCs 的颗粒细胞完全扩散(图 1B,C)。由表 1 可知, I 组颗粒细胞完全扩散的卵母细胞率显著高于 II 组($P < 0.05$), 极显著高于 III 组($P < 0.01$), 而 II 组和 III 组差异不显著($P > 0.05$)。表明应用 U racil 和 ITS 能够促进颗粒细胞增殖, ATP 对颗粒细胞增殖没有明显效果, 说明颗粒细胞利用溶液中 ATP 的能力较差。

表 1 U racil, ITS 和 ATP 对颗粒细胞增殖的影响
Table 1 Effect of U racil, ITS, and ATP on the proliferation of granule cells

组别 Group	卵母细胞总数 Number of oocytes	颗粒细胞完全扩散的卵母细胞 Oocytes with full amplified granule cells	
		细胞数 Number of cell	细胞率/% Rate of cell
I	197	172	87.31 aA
II	112	79	70.54 bAB
III(CK)	106	73	68.67 bB

注: 同列数据不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$), 不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$)。下表同。

Note: Different small letter in superscripts within the same column stands for differ significantly ($P < 0.05$), the different capital letter is differ significantly ($P < 0.01$). The same as follow s

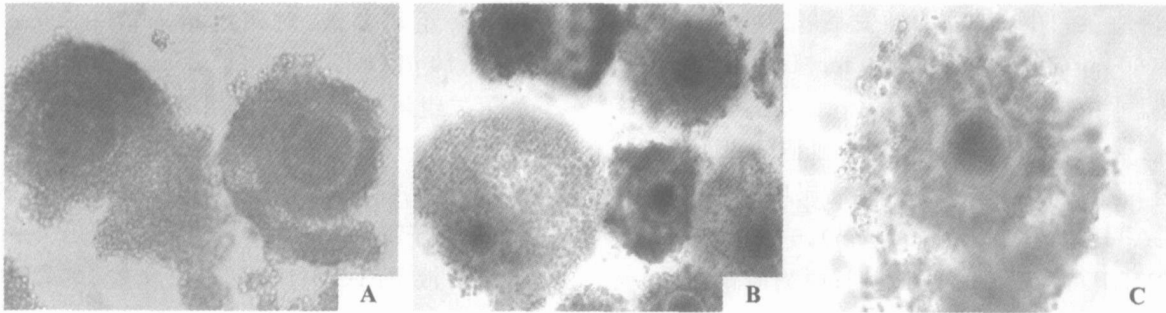


图 1 成熟前后牛 COCs

A. 成熟前牛 COCs($\times 400$); B. 成熟后牛 COCs($\times 100$); C. 成熟后颗粒细胞完全扩散的 COCs($\times 400$)

Fig 1 Immaturated and matured bovine COCs

A. Prematurated bovines' COCs ($\times 400$); B. Maturated bovines' COCs($\times 100$); C. COCs with granule cells full amplification ($\times 400$)

2.2 U racil, ITS 和 ATP 对牛卵母细胞体外成熟的影响

由表 2 可知, I 组卵母细胞的成熟率、卵裂率及 8~ 16 细胞率均极显著高于 III 组 ($P < 0.01$), 表明线粒体保护剂能够促进卵母细胞成熟、卵裂及孤雌激

活胚胎的发育; II 组卵母细胞的 8~ 16 细胞率低于 I 组, 但差异不显著 ($P > 0.05$), 而卵裂率及 8~ 16 细胞率显著高于 III 组 ($P < 0.05$)。表明牛卵母细胞利用 ATP 的能力差, 但 ATP 对孤雌激活胚胎发育有保护和促进作用。

表 2 U racil, ITS 和 ATP 对牛卵母细胞体外成熟的影响

Table 2 Effect of U racil, ITS, and ATP on NM of bovine oocytes

组别 Group	卵母细胞总数 Number of oocytes cultured	成熟率/% Maturation rate	卵裂率/% Cleavage rate	8~ 16 细胞率/% Percentage of embryos with 8~ 16 cell
I	223	72.65 (162/223) aA	55.56 (90/162) aA	35.56 (32/90) aA
II	207	60.39 (125/207) bAB	48.80 (61/125) bAB	34.43 (21/61) aAB
III(CK)	240	57.92 (139/240) bB	43.88 (61/139) cB	24.59 (15/61) bB

2.3 U racil, ITS 和 ATP 对牛卵母细胞线粒体活性的影响

JC-1 染色后一部分卵母细胞线粒体的荧光减弱甚至消失(图 2 A, B), 表明牛卵母细胞在 NM 过程中一些外源性物质损伤了线粒体, 导致线粒体膜电势降低。由表 3 可以看出, I 组具有 JC-1 荧光的

牛卵母细胞百分率极显著高于 II 组 ($P < 0.01$) 和 III 组 ($P < 0.01$), II 组和 III 组之间差异不显著 ($P > 0.05$)。表明 U racil 和 ITS 能够保护和促进牛卵母细胞内线粒体的生长发育, 而 ATP 对线粒体的保护和促进发育较差。

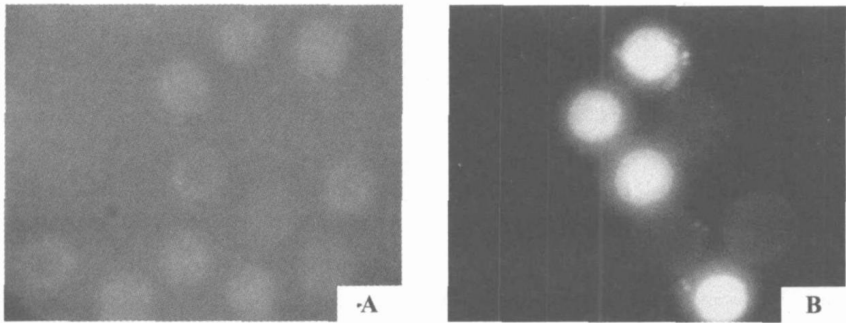


图 2 不同阶段牛卵母细胞 JC-1 染色结果

A. JC-1 染色成熟前牛卵母细胞 ($\times 100$); B. JC-1 染色成熟后牛卵母细胞 ($\times 100$)

Fig. 2 Stage of bovine oocytes stained by JC-1

A. Prematurated bovine oocytes stained by JC-1 ($\times 100$); B. Matured bovine oocytes stained by JC-1 ($\times 100$)

表 3 U racil, ITS 和 ATP 对牛卵母细胞线粒体活性的影响

Table 3 Effect of U racil, ITS, and ATP on the livability of the bovine oocytes' mitochondrion

组别 Group	卵母细胞总数 Number of oocytes	具有 JC-1 荧光的卵母细胞 Bovine oocytes stained by JC-1	
		细胞数 Number of cell	百分率/% Rate
I	45	23	51.11 A
II	45	18	40.00 aBC
III(CK)	45	15	33.33 aC

3 讨论

颗粒细胞在牛卵母细胞体外成熟过程中起重要作用, 它不仅有助于卵母细胞胞浆成熟, 而且还影响胚胎的发育^[5]。Shiyya 等^[6]认为, 选择颗粒细胞完整的卵母细胞进行 NM 是被普遍认可的标准。有颗粒

细胞包裹的卵母细胞, 其成熟率及受精率均较裸卵的高。颗粒细胞通过其间的缝隙连接 (Gap Junction) 调节卵母细胞的生长及其减数分裂能力^[7]。Tanghe 等^[8]研究表明, 卵母细胞发育过程中, 颗粒细胞能提供营养物质和信号转导通路。本试验结果显示, 线粒体保护剂组 (即 I 组) 颗粒细胞完全

扩散的卵母细胞率极显著高于对照组(即III组)($P < 0.01$),表明线粒体保护剂能够促进颗粒细胞的增殖,从而为卵母细胞成熟提供营养及信号物质;而II组颗粒细胞完全扩散的卵母细胞率显著低于I组($P < 0.05$),与III组差异不显著($P > 0.05$),表明ATP对颗粒细胞的增殖作用不明显。

线粒体是体内能量物质产生的场所,线粒体内膜上电子传递链在将还原型辅酶I(NADH)和还原型黄素腺嘌呤二核苷酸(FADH₂)上的电子传递给氧的过程中释放出自由能,用于ATP合成,这个过程是能量产生的关键步骤。外源性物质及环境因素的变化均能使NADH转变成氧化型,而不进行呼吸链中电子的传递过程,使能量产生障碍,进而影响卵母细胞体外成熟的效果。

卵母细胞内集聚大量的mRNA和蛋白是卵母细胞成熟的基本条件,Uracil是mRNA转录过程中的必须物质。ITS包括胰岛素、转铁蛋白和亚硒酸钠,其中胰岛素能刺激DNA、RNA、蛋白质和脂类的合成,从而调节脂膜、细胞内酶和细胞核的功能;转铁蛋白作为一种血清球蛋白有利于铁的转运,还可以将培养液中的毒性金属因子移去,因此可以作为一种脱毒蛋白;硒可以通过调节谷氨酰胺过氧化活性阻止游离氧对胚胎细胞的损伤。本试验结果表明,Uracil和ITS能够提高线粒体活性,进而提高牛卵母细胞成熟率及孤雌激活胚胎发育率。这与Stojkovic等^[9]的研究结果一致。本研究还发现,培养液中添加ATP可以保护和促进孤雌胚胎分裂及发育,但其作用机理还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Eppig J J. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals[J]. Reprod Fertil Dev, 1996, 8: 485-489
- [2] Bavister B D. Interactions between embryos and the culture milieu[J]. Theriogenology, 2000, 53: 619-626
- [3] Thompson J G, McNaughton C, Gasparini B, et al. Effect of inhibitors and uncouplers of oxidative phosphorylation during compaction and blastulation of bovine embryos cultured *in vitro*[J]. J Reprod Fertil, 2000, 118: 47-55
- [4] Nagai T. The improvement of *in vitro* maturation systems for bovine and porcine oocytes[J]. Theriogenology, 2001, 55: 1291-1301
- [5] Sirard M A, Parrish J J, Ware C B, et al. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos[J]. Biol Reprod, 1988, 36: 546-552
- [6] Shioya Y, Kuwayama M, Fukushima M, et al. *In vitro* fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified by cumulus cells and matured *in vitro*[J]. Theriogenology, 1988, 30: 489-496
- [7] Mary Jo Carabatsos, Caterina Sellitto, Daniel A Goodenough, et al. Oocyte-granulosa cell heterologous gap junctions are required for the coordination of nuclear and cytoplasmic meiotic competence[J]. Developmental Biology, 2000, 226: 167-179
- [8] Tanghe S, Van Soom A, Nauwynck H, et al. *In vitro* functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation and fertilization[J]. Molecular Reproduction and Development, 2002, 61: 414-424
- [9] Stojkovic M, Machado S A, Stojkovic P, et al. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture[J]. Biol Reprod, 2001, 64: 904-909

The effect of uracil and ITS on the bovine VM oocytes

WANG Hong-feng, WANG Xiao-lei, YU Hai-sheng, LEI An-min,
JIA Wen-wen, HUANG Wei-wei, DOU Zhong-ying

(Northwest A & F University, Shaanxi Branch of National Stem Cells Engineering & Technology Center, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In this paper how the Uracil, ITS, and ATP affect the *in vitro* maturation (VM) and viability of bovine oocytes was investigated. The result shows that the Uracil and ITS can promote the multiplication of the granule cells, and improve the maturation rate, cleavage rate, and 8-16 cell rate. ATP has not significant effect on the maturation rate of the oocytes, however it can enhance the viability of the parthenogenetic embryos.

Key words: bovine oocytes; mitochondrion; Uracil; ITS; ATP