

异体颗粒细胞线粒体移植对牛孤雌 激活胚胎发育的影响^{*}

王晓磊, 雷安民, 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] 为了探讨线粒体对孤雌激活胚胎发育潜能的影响, 比较了异体颗粒细胞线粒体移植的牛孤雌激活胚胎、胚胎培养液移植的孤雌激活胚胎和正常孤雌激活胚胎的发育情况。结果表明, 异体颗粒细胞线粒体移植组和胚胎培养液移植组的牛孤雌激活胚胎的激活率差异不显著($P > 0.05$), 但均显著低于正常激活组($P < 0.05$); 异体颗粒细胞线粒体移植组与正常激活组的孤雌激活胚胎卵裂率差异不显著($P > 0.05$), 但均明显高于胚胎培养液移植组($P < 0.05$); 异体颗粒细胞线粒体移植组的孤雌激活胚胎桑椹胚率极显著高于胚胎培养液移植组和正常激活组($P < 0.01$)。可见牛异体颗粒细胞线粒体移植可改善牛孤雌激活胚的发育。

[关键词] 线粒体; 颗粒细胞; 牛孤雌胚胎

[中图分类号] S811.4

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)03-0025-04

Effect of allo-granular cells' mitochondria transfer on bovine parthenogenetic embryos' developmental potential

WANG Xiao-lei, LEI An-min, DOU Zhong-ying

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

Abstract: To investigate the effect of mitochondria on parthenogenetic embryos' developmental potential, the development of mitochondria injection embryos, medium injection embryos and normal activation embryos were compared. The results showed that there was no significant difference between the activation rates of allo-granular cells' mitochondria injection group and embryo culture medium injection group ($P > 0.05$), but activation rates of these two group were both lower than that of the normal activation group ($P < 0.05$); the cleavage rates of allo-granular cells' mitochondria injection group and normal activation group had no significant difference, but were higher than that of the medium injection group ($P < 0.05$); the morula rate of allo-granular cells' mitochondria injection group was higher than that of the medium injection group and normal activation group ($P < 0.01$). Therefore the allo-granular cells' mitochondria transfer improved the development of bovine parthenogenetic embryos.

Key words: mitochondria; granular cells; parthenogenetic embryos

线粒体是真核细胞内重要的半自主性细胞器, 通过氧化磷酸化为细胞各种生命活动提供能量。有研究表明, 卵胞质中线粒体DNA (mtDNA) 含量的降低^[1]和ATP含量的减少^[2], 以及线粒体DNA的缺失^[3]均能降低卵母细胞的受精能力和受精后胚胎

的发育能力, 是老龄妇女和老龄动物不孕和生殖机能下降的主要原因之一。Cohen等^[4]用显微注射的方法将年轻妇女卵子5%~10%的细胞质注入体外受精反复失败患者和生育年龄较大患者的卵子内, 结果发现胚胎质量明显改善, 并有健康的胎儿出生。

* [收稿日期] 2006-03-13

[基金项目] 国家“863”计划项目(2002AA216161); 教育部重大项目(03160)

[作者简介] 王晓磊(1980-), 男, 河南许昌人, 在读硕士, 主要从事牛、羊克隆研究。E-mail: wxl0284@sina.com

[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与干细胞工程研究。E-mail: douzhongying@china.com

被移植的卵细胞质中含有线粒体 mRNA、蛋白质及多种细胞因子, 这些均对卵子和胚胎的发育起一定作用, 但一般认为起主要作用的是线粒体^[5]。细胞质移植虽然在临床取得了一定的疗效, 并有健康的婴儿出生, 但是有关此项操作的安全性和有效性仍存在争议。主要问题是异体卵细胞质移植可能传播线粒体遗传疾病。Shourbagy 等^[6]也认为, 卵母细胞中的线粒体数量对于随后胚胎发育的顺利进行非常重要。孔令红等^[7]研究发现, 妇女自身颗粒细胞线粒体移植能明显改善胚胎的发育质量, 这样避免了异体卵细胞质移植可能传播线粒体遗传疾病的问题, 但至今尚未对线粒体移植时被注入到卵子中的液体作用的探讨, 本试验则对被注入到牛卵中的液体的作用进行了研究, 以期明确牛孤雌激活胚胎发育得以改善的深层机理。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 牛卵巢 取自西安市某屠宰场, 置于 20~38 ℃ 加有 100 IU/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的生理盐水的保温瓶中, 5 h 内运回实验室。

1.1.2 主要试剂及仪器 高糖 DMEM、TCM-199、胎牛血清(FBS)均为 Gibco 公司产品; 新生牛血清(NBS), 实验室自制; 透明质酸酶 6-二甲胺基嘌呤(6-DMAP)、离子霉素、细胞松弛素 B、尿嘧啶、亚牛磺酸、促卵泡激素(FSH)、三价因子(胰岛素, 转铁蛋白和亚硒酸钠、三磷酸腺苷(ATP))和促黄体生成激素(LH)均为 Sigma 公司生产; MitoTracker Green FM, Molecular Probes(USA)公司产品; 丙酮酸钠, Serva 公司生产; 表皮生长因子, R & D 公司生产。

高速冷冻离心机(ALC PM 180R, 意大利); 显微操作仪(LEICA DM IRB, 德国); 煅针仪(NARISHIGE PN-30, 日本); Leica 倒置荧光显微镜(LEICA DM IRB)。

1.1.3 主要溶液配制 低渗液 RSB: 10 mmol/L NaCl+ 2.5 mmol/L MgCl₂+ 10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5。高渗液 2.5 倍 MS: 525 mmol/L 甘露醇+ 175 mmol/L 蔗糖+ 12.5 mmol/L Tris-HCl+ 2.5 mmol/L EDTA, pH 7.5。牛颗粒细胞培养液: 高糖 DMEM + 体积分数 10% NBS。线粒体标记液: MitoTracker Green FM 用二甲基亚砷溶解后, 再用高糖 DMEM 基础液稀释为 200 nmol/L。牛卵母细胞成熟液: TCM-199+ 10 μg/L 表皮生长因子+ 5 mmol/L 亚牛磺酸+ 10 μg/L FSH+ 10 μg/L LH+

3 g/L BSA。牛卵母细胞操作液: TCM-199+ 体积分数 20% FBS。牛胚胎培养液: TCM-199+ 0.25 mg/mL ATP+ 0.1 mg/mL 丙酮酸钠+ 体积分数 10% FBS+ 50 μL/mL 三价因子+ 50 μg/mL 尿嘧啶。

1.2 牛卵母细胞的分离及体外成熟培养

用 5 mL 一次性注射器和 16 号针头从牛卵巢表面 2~8 mm 卵泡中抽吸卵泡液, 在体视显微镜下选出胞质均匀、卵丘细胞致密的卵母细胞, 操作液洗涤 3 次, 移入平衡 2 h 的 600 μL 卵母细胞成熟液中, 在 38.0 ℃、体积分数 5% CO₂ 和相对饱和湿度的培养箱中成熟培养 22~24 h。

1.3 牛颗粒细胞的分离与培养

成熟后的牛卵丘卵母细胞复合体经 3 mg/mL 透明质酸酶消化, 吸出牛卵母细胞后, 1 000 r/min 离心 5 min 收集颗粒细胞, 用颗粒细胞培养液将其浓度调整为 $2.0 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 后, 接种到直径 10.0 cm 的培养皿中, 在 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 饱和湿度条件下扩增培养, 2 d 后镜检。

1.4 牛颗粒细胞线粒体的提取及检测

将培养的颗粒细胞消化、计数, 取 10^4 mL^{-1} 细胞悬液 2 mL, 1 000 r/min 离心 10 min 收集沉淀(细胞), 用 6.6 mL RSB 低渗液悬浮细胞, 8 min 后移入 15 mL 的玻璃匀浆器(置于冰水混合物)中, 研磨使膨胀细胞破碎, 立刻加入 4.8 mL 的 2.5 倍 MS 高渗液, 混匀。1 000 × g 离心 10 min 去除未破碎的细胞、细胞核及较大的细胞碎片。取 3/4 上清液(下面 1/4 杂质较多)10 000 × g, 4 ℃ 离心 20 min, 弃去上清, 沉淀物即为线粒体。取少许线粒体用体积分数 4% 戊二醛固定后, 送第四军医大学做透射电镜检测, 观察其外膜和嵴的完整性。

其余线粒体沉淀用 50 μL 牛胚胎培养液悬浮后, 向其中加入 50 μL 线粒体标记液, 使 MitoTracker Green FM 的终浓度为 100 nmol/L, 38 ℃ 作用 30 min 后, 加入 1 mL 牛胚胎培养液, 10 000 × g 离心 20 min 弃上清(除去多余的 MitoTracker Green FM)。沉淀用 30 μL 牛胚胎培养液悬浮, 吸取 10 μL 悬液滴于直径 3.5 cm 的一次性培养皿中, 用干净盖玻片将液滴涂成均匀薄层后, 迅速在 Leica 倒置荧光显微镜紫色激发光下, 400 倍暗视野观察是否有发绿色荧光的线粒体。

1.5 牛颗粒细胞线粒体移植

将成熟牛卵母细胞在 3 mg/mL 透明质酸酶中作用 2 min(脱去卵丘颗粒细胞), 再用操作液洗涤 3

次, 然后接种于含 $5 \mu\text{mol/L}$ 细胞松弛素B 的操作液中, 在 38.5°C 、体积分数 5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养, 5 min 后随机分为 2 组。1 组牛卵母细胞放入提前 1 h 提取完成并在培养箱中温育好的 $50 \mu\text{L}$ 线粒体悬液中, 上面覆盖胚胎培养用矿物油。将卵母细胞在第一极体处固定, 用自制的内径 $10 \mu\text{m}$ 的显微注射针吸入 $120 \mu\text{m}$ 的线粒体悬液后从固定针对面刺入卵母细胞中央, 将悬液缓缓注入卵胞质中。另 1 组牛卵母细胞置于胚胎培养液做的液滴中, 每个卵母细胞用上面的方法注入等量的胚胎培养液作对照。

1.6 牛颗粒细胞线粒体移植卵母细胞的孤雌激活及体外发育

将颗粒细胞线粒体移植的牛卵母细胞及成熟的脱去颗粒细胞的牛卵母细胞分别用操作液洗涤 3 次, 移入含 $5 \mu\text{mol/L}$ 离子酶素的牛胚胎培养液中避光激活 5 min 。再转移到含 2 mmol/L 6-DMAP 和 $5 \mu\text{mol/L}$ 细胞松弛素B 的胚胎培养液中, 在 38.5°C 、体积分数 5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养 4 h , 用胚胎培养液洗涤 3 次后, 置于 $50 \mu\text{L}$ 牛胚胎培养液微滴中, 上面覆盖胚胎培养用矿物油, 每个微滴放置约 20 枚牛卵母细胞, 每 48 h 换液 1 次并观察记录孤雌胚胎发育情况。

1.7 数据统计分析

采用 SPSS19.0 统计软件对孤雌胚胎的激活率、卵裂率和桑椹胚率进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 牛颗粒细胞的培养特性及其线粒体活性

结果显示, 培养 2 d 后牛颗粒细胞已经基本汇合形成单层, 形态为多角形、铺路石样, 细胞间界限不清(图 1)。

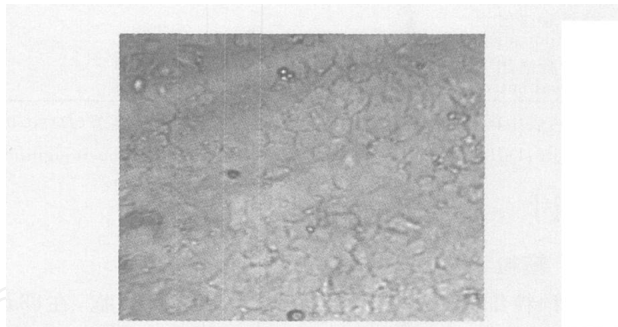


图 1 培养 2 d 的牛颗粒细胞照片 ($\times 100$)

Fig 1 Picture of bovine granular cells after culturing for 2 d

通过透射电镜观察可见, 牛颗粒细胞线粒体外膜完整, 平滑, 内膜折成长短不等的嵴, 线粒体中的空白部分为嵴与嵴之间的腔隙, 即嵴间腔(图 2)。线粒体经特异性荧光探针标记后在荧光显微镜下可观察到很强的绿色荧光, 呈长杆状、卵圆形或圆形小体(图 3), 说明提取的线粒体活力很强。

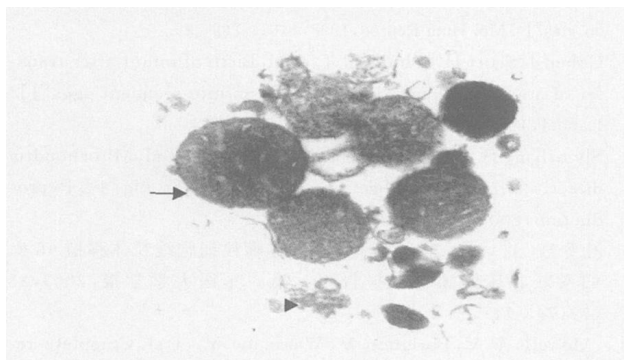


图 2 牛颗粒细胞线粒体透射电镜照片 ($\times 30\,000$)

→. 线粒体; ▲. 杂质

Fig 2 Bovine granular cells' mitochondria electron microscope picture

→. Mitochondria; ▲. Impurity granular cells

2.2 牛颗粒细胞线粒体移植对牛孤雌胚胎发育的影响

由表 1 可知, 牛颗粒细胞线粒体注射组与胚胎培养液注射组卵母细胞激活率差异不显著 ($P > 0.05$), 但均显著低于正常激活组 ($P < 0.05$); 牛颗粒细胞线粒体注射组与正常激活组的卵裂率差异不

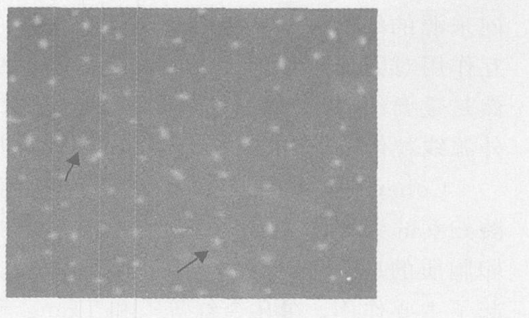


图 3 牛颗粒细胞线粒体荧光染色照片 ($\times 400$)

→. 线粒体

Fig 3 Fluorescence picture of bovine transmission mitochondria ($\times 400$)

→. Mitochondria

显著 ($P > 0.05$), 但二者的卵裂率均显著高于胚胎培养液注射组 ($P < 0.05$); 牛颗粒细胞线粒体移植组孤雌激活胚胎桑椹胚率极显著高于胚胎培养液移植组和正常激活组 ($P < 0.01$)。表明显微操作可能对牛卵母细胞造成了损伤, 降低了线粒体注射组和培养液注射组的激活率, 而在随后的胚胎发育中, 线

粒体改善了牛孤雌激活胚胎的卵裂率和桑椹胚率。

表 1 牛颗粒细胞线粒体移植对牛孤雌胚胎发育的影响

Table 1 The effect of mitochondria transfer on development of bovine parthenogenetic embryos

组别 Categories	成熟卵母细胞数 No. of matured oocytes	激活率/% Activation rate	卵裂率/% Cleavage rate	桑椹胚率/% Rate of morula
颗粒细胞线粒体注射组 M itochondria injection group	189	55 55(105/189) a	46 56(88/189) a	29 54(26/88) A
培养液注射组 M edium injection group	190	55 79(106/190) a	37 89(72/190) b	6 94 (5/72) C
正常激活组 N ormal activation group	192	63 54(122/192) b	46 35(89/192) a	15 73 (14/89) B

注:表中同列数据后标不同小写字母者表示差异显著($p < 0.05$);标不同大写字母者表示差异极显著($p < 0.01$)。

Note: Different small letters in the same column mean significant difference; different capital letters mean extreme difference

3 讨 论

3.1 颗粒细胞线粒体的选择

颗粒细胞是最靠近卵母细胞的组织细胞,在卵母细胞发育过程中为其提供营养物质和调节因子,其线粒体在形态和功能方面有较大的相似性,并且颗粒细胞获得方便,易培养,可为线粒体提取提供大量的细胞。因此,本试验选择颗粒细胞线粒体作为研究对象。

3.2 线粒体移植对孤雌胚胎发育的影响

在核移植研究中,供体细胞质中的mtDNA注入去核卵母细胞,虽然有时会因发生遗传漂移而逐渐减少,以至最终全部消失^[8]。但有时低水平的异质性mtDNA也能够在后代体内持久存在^[9],即来自供体细胞少量的mtDNA与卵母细胞自身的mtDNA将在重构胚中共存,说明胚胎和卵母细胞对不同来源的线粒体具有一定的兼容性,核-线粒体相互作用对卵母细胞内外源性线粒体的存活和复制虽然是重要的,但不是必需的。这为向卵母细胞中移植外源线粒体改善胚胎的发育提供了理论基础。

Cohen等^[4]将年轻妇女的部分卵胞质注入高龄妇女的卵子内,改善了高龄妇女胚胎的发育,由于卵胞质的成分比较复杂,他们推测是线粒体在其中起了主要作用。在孔令红等^[7]和Tzeng等^[10]的试验中,他们将提取的妇女自身颗粒细胞线粒体沉淀用人输卵管培养液悬浮后,将其连同单个精子注入到卵子中,结果发现线粒体注射后胚胎的发育显著好于对照组(未注射任何物质,只单纯体外受精)。但他们的试验均未设只注射人输卵管培养液的对照组,故不能排除输卵管培养液的影响,也不能直接证明是线粒体改善了胚胎的发育。本试验设2个对照组,一组为正常孤雌激活,另一组注射牛胚胎培养液,结果表明是注射的线粒体起到了改善胚胎发育的作

用。

本试验结果表明,牛异体颗粒细胞线粒体移植可改善牛孤雌激活胚胎的发育。

[参考文献]

- [1] Reynier P,May-Panloup P,Chretien M F.Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes[J].Mol Hum Reprod,2001,7(5):425-429
- [2] Blerkom J V,Davis P W,Lee J A.TP content of human oocytes and developmental potential and outcome after *in-vitro* fertilization and embryo transfer[J].Hum Reprod,1995,10(2):415-424
- [3] Volarcik K,Sheean L,Goldfarb J,et al.The meiotic competence of *in-vitro* matured human oocytes is influenced by donor age: evidence that folliculogenesis is compromised in the reproductively aged ovary[J].Hum Reprod,1998,13(1):154-160
- [4] Cohen J,Scott R,Alikani M,et al.Ooplasmic transfer in mature human oocytes[J].Mol Hum Reprod,1998,14(3):269-280
- [5] Cohen J,Scott H,Schimmel T,et al.Birth of infant after transfer of anucleate donor oocyctcytoplasm into recipient eggs[J].Lancet,1997,350:186-187
- [6] Shourbagy S H E,Spikings E C,Freitas M,et al.Mitochondria directly influence fertilization outcome in the pig[J].Reproduction,2006,131:233-245
- [7] 孔令红,刘忠,李红,等.经自体颗粒细胞线粒体移植46岁妇女获临床妊娠1例报告[J].第一军医大学学报,2003,23(7):743-747
- [8] Meirelles F V,Borignon V,Watanabe Y,et al.Complete replacement of the mitochondrial genotype in a *bos indicus* calf reconstructed by nuclear transfer to a *bos taurus* oocyte[J].Genetics,2001,158:351-356
- [9] Hiendleder S,Schmutz S M,Erhardt G,et al.Transmission of mitochondrial differences and varying levels of heteroplasmy in nuclear transfer cloned cattle[J].Mol Reprod Dev,1999,54(1):24-31
- [10] Tzeng C,Hsieh S,Chang N,et al.Pregnancy derived from mitochondrial transfer (MT) into oocyte from patients own cumulus cell (cGcs)[J].Fertil Steril,2001,76:176-180