

热应激对牛卵母细胞克隆胚体外发育的影响

张 弛¹, 曹俊伟^{1,2}, 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 内蒙古农业大学 生物工程学院, 内蒙古 呼和浩特 010018)

[摘 要] 为了了解牛卵母细胞经短时间(30 min)热应激和采用不同供体细胞对核移植后重构胚发育的影响, 对成熟前牛卵母细胞进行了不同温度(38.5(CK), 39.5, 40.5, 41.5 和 42.5 °C)热应激处理, 以牛胎儿成纤维细胞为供体细胞, 比较了重构胚的卵裂率和囊胚率; 将成熟前牛卵母细胞于 41.5 °C 热应激 30 min, 以未进行热应激处理的牛卵母细胞为对照, 比较了 3 种不同供体细胞(牛胎儿成纤维细胞、牛卵巢上皮细胞、牛颗粒细胞)核移植后的重构胚囊胚细胞数。结果表明, 成熟前牛卵母细胞经 41.5 °C 热应激处理 30 min, 其卵裂率(72.5%)和囊胚率(18.3%)与对照组(57.6%和 13.6%)相比均有显著提高($P < 0.05$); 当温度升高至 42.5 °C 后, 虽然卵裂率有所提高, 但囊胚率与对照组相比显著降低($P < 0.05$); 其他温度处理的卵裂率和囊胚率与对照无显著差异($P > 0.05$)。牛卵母细胞经 41.5 °C 热应激处理 30 min, 3 种供体细胞形成的重构胚囊胚细胞数差异不显著($P > 0.05$), 而且与其各自对照的囊胚细胞数差异也不显著($P > 0.05$)。说明 41.5 °C 可以作为牛卵母细胞热应激处理的最佳温度, 成熟前牛卵母细胞经 41.5 °C 热应激处理 30 min, 能有效提高核移植效率。

[关键词] 牛; 卵母细胞; 热应激; 细胞克隆; 核移植

[中图分类号] S823.3+6

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)12-0006-05

Effect of heat shock on nuclear transferred bovine oocytes development *in vitro*

ZHANG Chi¹, CAO Jun-Wei², ZHANG Yong¹

(1 Institute of Biological Engineering, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 College of Biological Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010018, China)

Abstract: To understand the effect of short-time (30 min) heat shock with bovine recipient oocytes and various donor cell on development of early nuclear transfer embryos, with the bovine fetal fibroblast cell as donor cell, the cleavage rate and blastocyst rate of cloned embryos were compared by heat shocked bovine oocytes before maturation at different temperature(38.5, 39.5, 40.5, 41.5 and 42.5 °C); the number of blastocyst cell was compared after reconstructing of three various donor cells(the fibroblast cell, the epithelial cell and the granulose cell) with the bovine oocytes which did not have a heat-shock treatment at 41.5 °C in 30 min. Experimental results showed that a heat-shock treatment at 41.5 °C could improve the cleavage rate(72.5%) and blastocyst rate(18.3%) of cloned embryo at the early stage in comparison with the control group (57.6% and 13.6%) ($P < 0.05$); after the heat-shock treatment at 42.5 °C, the cleavage rate increased, however, the blastocyst rate decreased significantly in comparison with the control group ($P < 0.05$); the cleavage and the blastocyst rate did not have change in comparison with the control group ($P > 0.05$) under other temperate heat-shock. Using the bovine oocytes under a heat-shock treatment at

* [收稿日期] 2006-12-08

[基金项目] 国家“863”高技术研究与发展计划项目(2001AA21380)

[作者简介] 张 弛(1982—), 男 陕西西安人, 在读硕士, 主要从事哺乳动物胚胎工程和发育生物学研究。

[通讯作者] 张 涌(1956—), 男, 内蒙古和林格尔人, 教授, 博士生导师, 主要从事哺乳动物胚胎工程和发育生物学研究。

41.5 °C, the number of blastocyst cell formed by three various donor cells ($P>0.05$) did not have significant difference. As a result, it was concluded that 41.5 °C was the best temperature for heat-shock treatment on recipient oocytes, and cloned embryo at the early stage under a heat-shock treatment at 41.5 °C for 30 min could lead to high bovine nuclear transfer efficiency.

Key words: bovine; oocyte; heat-shock; cells cloned; nuclear transfer

体细胞核移植技术从理论上证明了高度分化的细胞仍具有全能性,这已从近年来通过体细胞克隆成功的绵羊^[1]、山羊^[2]、牛^[3]、小鼠^[4]等动物上得到证实。这一技术的发展与应用,对动物生产医药工业以及珍稀动物的拯救具有非常重要的意义。但目前动物克隆技术普遍存在成功率低、技术不稳定、胎儿发育异常等问题,阻碍着细胞克隆技术的发展。其中,热应激对胚胎发育的影响一直是人们研究的热点。已有的试验表明,在炎热的夏季或者提高培养温度,使得卵母细胞或胚胎暴露在高温环境中,会减少其中诸如 GnRH、LH 等激素的分泌,对卵母细胞以及胚胎的发育造成不利影响^[5-7];另外一些研究表明,短期的热应激并不会对卵母细胞的发育以及功能产生有害影响^[8-9],甚至有研究表明,在桑椹胚阶段,温度的急剧上升能提高牛胚胎的发育率^[10]。目前虽然已经发现,对胚胎进行热应激处理可以促进胚胎的发育,但是对卵母细胞本身进行热应激是否可以促进核移植后重构胚的发育仍然不清楚。为此,本研究对核移植前的受体卵母细胞进行了短暂热处理,并且通过不同的供体细胞形成重构胚,研究卵母细胞热应激对核移植后胚胎的影响,以期为提高核移植效率提供参考。

1 材料与方法

1.1 牛卵母细胞的收集与处理

在西安市某屠宰场采集牛卵巢,立即置于盛有 30~37 °C 生理盐水的保温瓶中,在 2~3 h 内运回实验室。随后用含抗生素的等温生理盐水冲洗卵巢至无血水,剪除卵巢上的系膜。用带有 12 号针头的 10 mL 一次性注射器抽取卵巢表面直径为 2~8 mm 卵泡中的卵母细胞和卵泡液。静置片刻,放到实体显微镜下拣卵。挑选卵丘层紧密包裹的卵丘-卵母细胞复合体(Cumulus oocyte complexes, COC_s),用 PBS 冲洗 2~3 次,将挑出的卵母细胞在成熟前分成 5 个处理组,在饱和湿度、体积分数 5% CO₂ 条件下,分别于 38.5(对照组),39.5,40.5,41.5 和 42.5 °C 下热应激处理 30 min,而后移入成熟培养液中于培养箱内成熟 20~24 h。培养液预先在培养箱中至

少平衡 2 h,培养条件为 38.5 °C、体积分数 5% CO₂、饱和湿度。卵母细胞成熟培养液含 9.5 g/L TCM-199 media(Sigma)、10 mmol/L HEPES(Sigma)、1 mmol/L pyruvate (Sigma)、2.5 mmol/L glutamine (Sigma)、50 μg/mL gentamycin (Sigma)、0.075 U/mL HMG(人绒毛膜尿促性素,丽珠制药)、1 μg/mL 17β-E₂ (Sigma) 和体积分数 10% FBS (Gibco)。

1.2 牛供体细胞的准备

1.2.1 胎牛成纤维细胞及卵巢上皮细胞的准备
参照 Poothapillai 等^[11]的方法,将牛胎儿及卵巢用体积分数 75% 酒精浸泡 30 s,然后用 PBS 清洗 3~5 遍,将胎儿(去头、四肢、内脏)及卵巢表皮剪碎成 1 mm³ 小块。用 DMEM+体积分数 10% FBS 清洗 2 遍后,带有少量 DMEM 液体植块于培养皿中,待组织块贴壁后再补加含体积分数 10% FBS 的 DMEM,放入培养箱中。在 37 °C、体积分数 5% CO₂ 和饱和湿度条件下培养,待细胞刚刚汇合后,以质量分数 0.25% 胰蛋白酶消化后传代。传 2~3 代后,一部分用于试验,一部分冷冻保存。

1.2.2 颗粒细胞的准备 挑选形态良好、卵丘细胞紧密包裹的 COC_s, PBS 清洗 3 遍后放入体积分数 1% 的透明质酸酶中振荡 3 min,用 DMEM/F12+体积分数 10% FBS 洗涤离心后重悬,将细胞悬液以 1×10⁵/mL 接种至培养皿,同 1.2.1 方法培养,传 2~3 代后,一部分用于试验,一部分冷冻保存。

1.3 卵母细胞的核移植

核移植前 3~5 d,按照 Jonathan 等^[12]的方法,用血清饥饿法处理供体细胞,使其处于有丝分裂间期(G₀/G₁)。待卵母细胞成熟后,挑选卵丘层扩散良好的 COCs,放在含有体积分数 0.1% 透明质酸酶(Sigma)的 PBS(Sigma,无 Ca²⁺、Mg²⁺)液中。用吸管吹打几下,去除外围卵丘细胞层。然后在显微镜下挑选排出第一极体的卵母细胞,以每批 25~30 枚放入 50 μL TCM-199+体积分数 10% FBS+7.5 μg/mL CB 中,盖石蜡油,按照 Jong 等^[13]的方法,在显微操作仪上用外径 20 μm 的玻璃针去核。然后用外径 10 μm 的玻璃细管将带有完整细胞膜的供

体细胞注射到去核的卵母细胞的卵周间隙,在电融合液用电融合仪对细胞复合体进行电融合(参数 1.6 kV/cm 60 μ s)。融合液含 0.28 mol/mL 甘露醇、100 μ mol/mL MgCl₂、50 μ mol/mL CaCl₂ 和体积分数 0.01% BSA。

1.4 牛核移植胚胎的培养

将核移植后的重构胚激活,分组放入含有胚胎培养液的小皿中,上覆灭菌石蜡油,在 38.5 °C、体积分数 5% CO₂ 条件下培养,48 h 统计卵裂率,第 3 天半量换液并添加体积分数 5% FBS,第 8 天统计囊胚率。胚胎培养液 mSOF 含体积分数 2% 非必需氨基酸(Gibco BRL)、体积分数 1% 必需氨基酸(Gibco BRL)、10 μ g/mL 胰岛素(Sigma)、10 μ mol/L Na₂EDTA 和 1 mmol/L 谷胱甘肽(Sigma)。

1.5 卵母细胞热应激与供体细胞对重构胚胚胎质量的影响

将牛卵母细胞于成熟前在 41.5 °C、体积分数 5% CO₂ 条件下热应激 30 min,然后用 3 种不同的供体细胞(胎儿成纤维细胞、卵巢上皮细胞、颗粒细胞)

分别进行核移植形成重构胚,与未热应激处理卵母细胞形成的重构胚对照。激活培养至囊胚后取第 8 天囊胚,用 PBS 洗 3 遍后用体积分数 4% 的甲醛固定过夜,然后将胚胎移入质量分数 1% 的 Triton X-100 中过夜,用 Hoechst 33342 染色,于荧光显微镜下观察并计数。

1.6 数据统计

对所得数据用 DPS 数据处理软件进行检验。

2 结果与分析

2.1 牛供体细胞以及重构胚的形态学观察

本试验分别以 3 种体细胞(牛胎儿成纤维细胞、牛卵巢上皮细胞、牛颗粒细胞)作为供体细胞培养,传代后培养至细胞单层(图 1),放至 NIKON 倒置显微镜下观察可见,细胞结构清晰,图案明显,细胞形态规则且排列有序,颜色清亮透明。如图 2 所示,用热应激卵母细胞与牛胎儿成纤维供体细胞形成的重构胚,轮廓清晰,胞质均匀,重构胚早期发育速度与体内发育速度基本一致,能发育到囊胚。

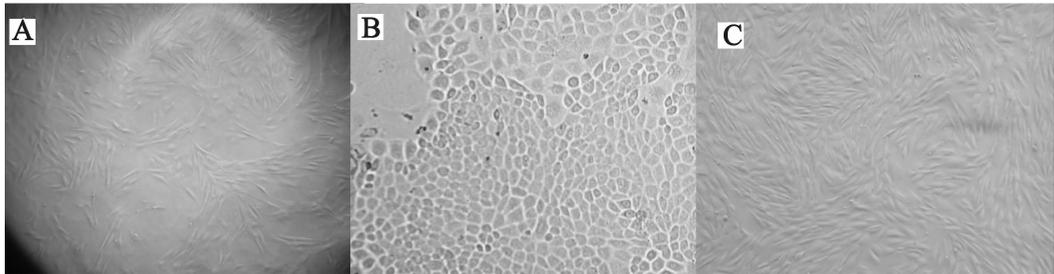


图 1 培养至细胞单层的牛供体细胞($\times 100$)

A. 牛胎儿成纤维细胞;B. 牛卵巢上皮细胞;C. 牛颗粒细胞

Fig. 1 Monolayer cultured bovine donor cells ($\times 100$)

A. Fetal fibroblasts cells;B. Ovary epithelial cells;C. Granulosa cells

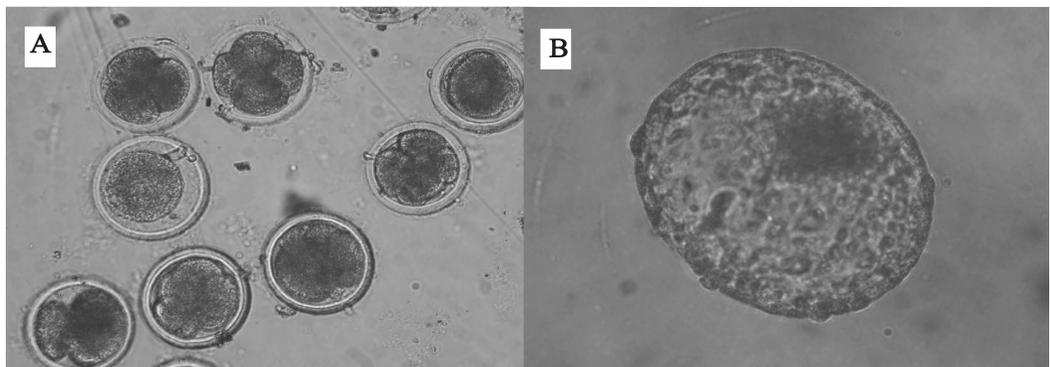


图 2 热应激后由牛胎儿成纤维细胞形成的重构胚发育情况($\times 100$)

A. 4~8 细胞时期牛胚胎;B. 囊胚期牛胚胎

Fig. 2 Development situation of reconstruct embryo ($\times 100$)

A. Stage of 4-8 cell bovine embryo;B. Stage of bovine embryo

2.2 不同温度下牛卵母细胞热应激对核移植后胚胎发育的影响

本试验以牛胎儿成纤维细胞为供体细胞。由表1可知,对照和各处理组的卵裂率分别为57.6%,56.5%,60.0%,72.5%和66.1%;囊胚率分别为13.6%,13.7%,12.2%,18.3%和7.4%。这说明对于早期卵母细胞,在短时间内受到一定温度(39.5℃,40.5℃)热应激,不会影响到核移植胚胎的卵裂

表1 卵母细胞热应激对核移植后胚胎发育的影响

Table 1 Effect of heat shock on bovine nuclear transfer embryonic development

处理温度/℃ Temperature	重构胚数 No. embryo	卵裂率/% Cleavage rate	8~16 细胞胚率/% 8-16 cell embryo rate	囊胚率/% Blastocyst rate
38.5 (CK)	118	57.6(68/118)a	36.4(43/118)a	13.6(16/118)a
39.5	124	56.5(70/124)a	37.1(46/124)a	13.7(17/124)a
40.5	115	60.0(69/115)a	38.3(44/115)a	12.2(14/115)a
41.5	142	72.5(103/142)b	45.8(65/142)b	18.3(28/142)b
42.5	121	66.1(80/121)b	33.9(41/121)a	7.4(9/121)c

注:同一列数据后标注相同小写字母者表示差异不显著($P>0.05$)。

Note: Data with same small letters within same columns indicate insignificant difference ($P>0.05$).

2.3 热应激与供体细胞对牛重构胚胚胎质量的影响

囊胚细胞数作为一个重要的胚胎质量指标,可反映出胚胎质量的优劣和胚胎后续发育的潜力。由表2可知,牛卵母细胞在成熟前于41.5℃下热应激

率和囊胚率($P>0.05$);当处理温度达到41.5℃后,胚胎卵裂率以及囊胚率都有了显著提高($P<0.05$);然而当处理温度升高到42.5℃时,该处理组卵裂率与对照组相比明显提高,但是从8细胞阶段开始,胚胎的发育明显受到影响,发育情况呈下降趋势,到囊胚阶段,发育率显著低于对照组($P<0.05$)。

30 min,核移植形成的重构胚与未热应激卵母细胞形成的重构胚相比,囊胚细胞数目没有明显差异($P>0.05$)。该结果说明,胚胎质量并未因热应激而受到损伤。并且3种不同供体细胞得出的结果相同,表明此结果与供体细胞无关。

表2 热应激与供体细胞对牛重构胚胚胎质量的影响

Table 2 Effect of heat shock and different donor cells on embryonic quality in various donor cells

供体细胞	处理 Treatments	重构胚数 No. of reconstructed embryos	囊胚细胞数 Blastocyst total cell number
成纤维细胞	热应激	12	90.4
Fibroblast cell	CK	12	92.8
颗粒细胞	热应激	11	88.6
Granulose cell	CK	11	90.9
上皮细胞	热应激	14	91.4
Epithelial cell	CK	14	91.8

3 结论与讨论

本研究发现,经过41.5℃热应激30 min的牛卵母细胞作为受体细胞进行核移植,可以提高胚胎的发育率,而温度过低不会促进胚胎的发育,温度过高也不利于胚胎的发育。以前的研究表明,热处理30 min为最佳时间^[8-10],因此,本研究并没有对热处理时间进行对比试验。在体细胞克隆中,分化的体细胞支持整个重组胚胎的发育,所以当供体细胞核被移入去核的卵母细胞后,必须发生基因的重编程(Reprogramming),从而建立起与正常胚胎发育一致的基因表达时空模式^[14]。影响重编程的因素,包括供体核自身因素以及卵母细胞中母源因子的作用。对斑马鱼卵子发生和早期胚胎发育过程中母源

因子的产生和定位研究表明,这些母源因子在胚胎轴系发生、生殖层和生殖细胞特化以及早期胚胎发育过程等方面起着重要的作用^[15]。热休克因子(Heat shock factors, HSFs)是影响重构胚发育的母源因子,是由一些在细胞水平和分子水平上的调节转录因子的功能集团组成的,当细胞或组织受到热刺激或重金属刺激时,其能促使供体细胞DNA活化,激活合成热休克蛋白(Heat shock protein, HSP)的系统,合成大量的HSP, Vilma等^[16]通过RT-PCR方法也证明了这一结果。Christians等^[17]对小鼠的研究发现,缺失母源因子热休克因子1(Heat shock factor 1, HSF1)后将导致发育阻断,对早期胚胎的发育产生不利影响。HSP可以使胚胎抵抗热刺激以及其他刺激对胚胎发育造成的有害影

响,并且 HSP 可以将牛胚胎细胞内的有毒有害物质移出,使细胞内的成分在体外仍然能进行新陈代谢^[18]。本试验中,经 42.5 °C 热应激处理的牛卵母细胞,其重构胚胎卵裂率虽然有所提高,但是在胚胎发育后期,囊胚率却急剧下降,这与前人的研究结果一致^[7,19],但是造成这种现象的原因尚不清楚,有待于进一步研究。本试验通过统计囊胚细胞数目来衡量热应激对胚胎质量以及后续发育能力的影响,同样,内细胞团细胞(ICM)/滋养层细胞(TE)比例和染色体形态也可用以比较胚胎质量的优劣,将来的研究可以从这些方面来验证。

对于提高核移植效率的研究,目前主要集中在供体细胞处理和显微操作过程等方面,有关卵母细胞质对克隆胚发育影响的研究还很少。本试验从卵母细胞热应激角度初步研究了母源因子对于克隆胚发育的影响。然而,HSFs 只是众多影响早期胚胎发育的母源因子中的一种,还有许多母源因子如合子阻滞因子、核质素 2、透明质蛋白 3、E-钙粘蛋白等,其对于早期胚胎,特别是核移植后的重构胚发育也有重要的影响。因此,研究卵母细胞成熟和早期发育期间母系 RNA 分子的定位、蛋白质的表达以及对于供体细胞核重编程的调控机制是非常必要的,这将有利于更好地了解克隆胚胎的发育机制,并有利于对克隆动物研究方法的优化。

[参考文献]

[1] Wilmut I, Schnieke A E, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells[J]. Nature, 1997, 385:810-813.

[2] 郭继彤,安志兴,张涌,等.成年耳细胞克隆山羊(*Capra hircus*) [J]. 中国科学:C辑,2002,32(1):77-83.

[3] Lanza R P, Cibelli J B, Diaz C, et al. Cloning of endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer[J]. Cloning, 2000, 2:79-90.

[4] Wakayama T, Perry A C, Zuccotti M, et al. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei[J]. Nature, 1998, 394:369-373.

[5] Wolfenson D, Thatcher W W, Bedinga L, et al. Effect of heat stress on follicular development during the estrous cycle in lactating dairy cattle[J]. Biol Reprod, 1995, 52:1106-1113.

[6] Fabio D R, Rex J S. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow—a review [J]. Theriogenology, 2003, 60:1139-1151.

[7] Franco M, Block J, Jousan F D, et al. Effect of transfer of one or two *in vitro*-produced embryos and post transfer administration of gonadotropin releasing hormone on pregnancy rates of heat-stressed dairy cattle [J]. Theriogenology, 2006, 66: 224-233.

[8] Ju J C, Parks J E, Yang X, et al. Thermo tolerance of IVM-derived bovine oocytes and embryos after short-term heat shock [J]. Mol Reprod Dev, 1999, 53:336-340.

[9] Suzuki H, Ju J C, Parks J E, et al. Surface ultrastructural characteristics of bovine oocytes following heatshock [J]. J Reprod Dev, 1998, 44:345-351.

[10] Ryan D P, Blakewood E G, Lynn J W, et al. Effect of heat-stress on bovine embryo development *in vitro* [J]. Anim sci, 1992, 70:3490-3497.

[11] Poothapillai K, Jason G K, Pedro N M, et al. Effect of fibroblast donor cell age and cell cycle on development of bovine nuclear transfer embryos *in vitro* [J]. Biology of Reproduction, 2001, 64:1487-1493.

[12] Jonathan R H, Quinton A W, Charles R L, et al. Development rates of male bovine nuclear transfer embryos derived from adult and fetal cells [J]. Biology of Reproduction, 2000, 62: 1135-1140.

[13] Jong S B, Sung L L, Sun A O, et al. Developmental rate and ploidy of embryos produced by nuclear transfer with different activation treatments in cattle [J]. Animal Reproduction Science, 2006, 92:37-49.

[14] 李世杰,杜卫华,李宁,等.体细胞克隆中核的重编程 [J]. 科学通报, 2004, 49:721-726.

[15] Francisco P. Maternal factors in zebrafish development [J]. DevDyn, 2003, 228:535-554.

[16] Vilma L, Eva C, Marketa S, et al. Expression of heat shock protein 70 in pig oocytes; Heat shock response during oocyte growth [J]. Animal Reproduction Science, 2006, 96:154-164.

[17] Christians E S, Thoma S D. Maternal effect of HSF1 on reproductive success [J]. Nature, 2000, 407:693-694.

[18] Neuer A, Spandorfer S D, Giraldo P, et al. The role of heat shock proteins *in vitro* [J]. Human Reproduction, 2000, 6: 149-159.

[19] Ju J C, Jiang S, Parks J E, et al. Heat shock reduces developmental competence and alters spindle configuration of bovine oocytes [J]. Theriogenology, 2005, 64:1677-1689.