

孵育和激活剂作用时间对山羊核移植胚胎早期发育的影响

李 斌^{1,2}, 曹陈冲², 陈立子², 汪存利², 赵 焕², 李东伟², 陶 勇², 章美林², 章孝荣^{2*}
(1. 上海交通大学医学院附属第九人民医院, 上海 200011; 2. 安徽农业大学动物科技学院, 合肥 233036)

摘 要: 探讨了电融合前对重构卵继续孵育及激活剂 6-DMAP 不同作用时间对山羊核移植胚胎体外发育的影响。结果显示, 重构卵在成熟液中继续培养后, 9~10 h 组的融合后卵子死亡率(27.42%)显著低于 30 min 和 90 min 组(49.26%和 56.3%) ($P<0.05$), 胚胎卵裂率(68.15%)则显著高于 30 min 和 90 min 组(55.6%和 54.24%) ($P<0.05$); 重构卵用离子霉素激活后, 再用 6-DMAP 激活 0 h、2 h、3 h、4 h、5 h 及 8~10 h, 各组间的胚胎卵裂率均无显著差异 ($P>0.05$), 但均显著高于未用 6-DMAP 组的卵裂率 ($P<0.05$)。本试验结果表明, 电融合前, 继续成熟培养重构卵有利于降低电融合时的卵子死亡率, 提高卵子利用率; 联合使用离子霉素和 6-DMAP 有利于提高激活效果, 而 6-DMAP 的作用时间(2~10 h)不影响核移植胚胎的卵裂。

关键词: 山羊; 重构卵; 核移植胚胎; 化学激活; 6-DMAP

中图分类号: S828.36

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2014)01-0010-04

Effects of incubation time and activation time of 6-DMAP on the early development of the goat nuclear transplanted embryos

LI Bin^{1,2}, CAO Chenchong², CHEN Lizhi², WANG Cunli², ZHAO Huan²,
LI Dongwei², TAO Yong², ZHANG Meiling², ZHANG Xiaorong²

(1. Shanghai Ninth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011;

2. School of Animal Sciences and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 233036)

Abstract: The study was conducted to examine the effects of incubation time before the electrofusion and activation time of 6-DMAP on the development of the goat nuclear transplanted embryos *in vitro*. The reconstructed oocytes were continually cultured in a maturation medium for 30 min, 90 min and 9-10 h before the electrofusion, respectively. The results showed that the mortality of reconstructed oocytes of 9-10 h group after the electrofusion was significantly lower than those of 30 min and 90 min groups (27.42% vs. 49.26% and 56.3%, $P<0.05$), while the cleavage rate of 9-10 h group was significantly higher than those of 30 min and 90 min groups (68.15% vs. 55.6% and 54.24%, $P<0.05$). The nuclear transplanted embryos activated by ionomycin were activated with 6-DMAP for 0 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, and 8-10 h respectively. The results showed that the cleavage rate was not significantly different among groups ($P>0.05$), but it was significantly higher than that of the embryos without 6-DMAP ($P<0.05$). In conclusion, the continued incubation of reconstructed oocytes before electrofusion may be helpful for lowering the mortality of fusion and increasing the rate of available oocyte; the combination of ionomycin with 6-DMAP could improve the activation efficiency in goat nuclear transplanted embryos, and activation time of 6-DMAP has no significant effects on the cleavage of goat nuclear transplanted embryos.

Key words: goat; reconstructed oocyte; nuclear transplanted embryo; chemical activation; 6-DMAP

目前, 核移植操作时的卵母细胞来源主要是来自于屠宰场采集的卵巢, 但是因屠宰场的卵巢处于不同时期、卵巢上的卵泡大小差异较大等问题造成了收集到的卵母细胞在体外成熟上的不同步^[1-2]。当

收稿日期: 2013-05-21

基金项目: 上海高校选拔培养优秀青年教师科研专项基金 (zzjdyx12106), 安徽省“十五”重大科技专项(04003005)和“十一五”科技攻关项目(06013051A)共同资助。

作者简介: 李 斌, 博士。E-mail: libinliccc@163.com

* 通信作者: 章孝荣, 博士, 教授, 博士生导师。E-mail: zxr@ahau.edu.cn

前, 卵母细胞体外完全成熟的判断标准为第一极体的排出^[3], 但第一极体的排出仅仅代表了细胞核的成熟, 而不能作为胞质成熟的标准^[4], 细胞质也必须发生相应的改变, 才能使卵母细胞具备进行受精及胚胎阶段发育的能力^[5]。为此, 本研究推测这些胞质未成熟卵母细胞的电击承受力可能会比较弱, 在电融合时重构卵易出现大量死亡, 降低卵子利用率, 这样势必会影响核移植的总效率。以往的研究多集中在卵母细胞的成熟效果上, 而对电融合前重构卵的再培养与重构胚胎早期发育关系的研究报道不多。

在化学激活效果的研究上, 人们多数集中在比较离子霉素的单独使用和联合使用其他种类激活物质后获得的激活效果上^[6-8], 而对于 6-二甲基氨基嘌呤 (6-dimethylaminopurine, 6-DMAP) 作用时间对重构胚早期发育的影响尚缺少详细报道。本试验就上面两个问题进行深入研究, 以期进一步优化现有核移植的程序, 提高核移植的效率。

1 材料与方法

1.1 卵母细胞的采集与成熟培养

用切割法从黄淮白山羊卵巢 (采集自安徽凤台县集中屠宰户) 上收集含有 3 层以上完整致密的卵丘-卵母细胞复合体 (COCs), 将 COCs 移入成熟培养液 (M199, $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 或 $1 \text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$ FSH/LH, $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ E_2 , $0.3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 丙酮酸钠, 10% FCS, $75 \text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素和 $75 \text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 链霉素) 中, 每 $50 \mu\text{L}$ 液滴培养 10 枚 COCs, 置于 38.5°C 、5% CO_2 、饱和湿度的培养箱条件下培养。

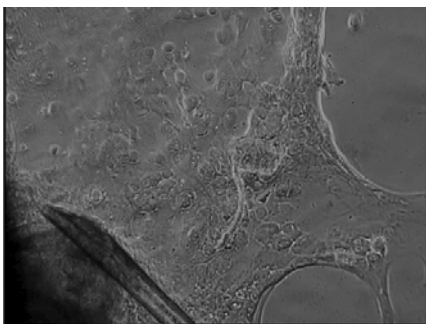


图 1 组织块法培养的山羊原代皮肤成纤维细胞

Figure 1 Primary fibroblast cells of Bore goat by the method of explanted tissue culture

1.2 供体细胞培养

自波尔山羊耳部剪取一块组织, 用 75% 酒精浸泡 60 s 后用无菌生理盐水洗 3 遍, 置于 4°C 生理盐水中带回实验室。无菌条件下, 将组织块充分剪碎,

根据文献[9]描述方法进行细胞原代和传代培养后, 得到的山羊耳皮肤成纤维细胞用于核移植 (图 1)。

1.3 核移植程序

1.3.1 供体细胞的准备 核移植前 30 min 用 0.25% 的胰蛋白酶消化分离 10 代内波尔山羊耳成纤维细胞, 制备细胞悬液, 然后分装到 0.5 mL 离心管中置于 $2\sim 8^\circ\text{C}$ 冷藏待用。

1.3.2 受体卵母细胞的准备 卵母细胞在成熟培养 19~22 h 时, 用 0.1% 的透明质酸酶处理并配合玻璃细管的吹打除去卵丘颗粒细胞, 在体视显微镜下挑出有第一极体排出的卵母细胞, 移入 M199 培养液中, 置于培养箱中备用。

1.3.3 核移植重构卵的制备 将供体细胞和受体卵母细胞移入 $100 \mu\text{L}$ 显微操作液 (含细胞松弛素 B $7.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 M_2 培养基) 中, 置于培养箱中孵育 15~30 min 后, 在显微操作仪上用固定针固定卵母细胞, 使其第一极体位于 12:00~1:00 处, 将注射针从 2:00~3:00 位置进针刺破透明带, 吸除第一极体及周围部分胞质完成去核操作。随后, 用注射针吸取边缘光滑、形态较圆的供体细胞, 经原切口处将其注入透明带下, 轻压透明带, 使供体细胞与受体胞质贴紧, 完成核移植重构卵的构建。

1.3.4 电融合 电融合操作前, 将重构卵置于体视显微镜下检查, 以质膜是否破裂为卵子死亡标准, 剔除死亡的重构卵, 可用的重构卵在 37°C 预热的电融合液 (甘露醇 $0.28 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 醋酸钙 $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 醋酸镁 $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, HEPES $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, BSA $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 中洗 3 遍。将重构卵移入融合槽, 在体视显微镜下用实心玻璃针轻轻拨动重构卵, 使供核细胞膜与胞质膜的接触面与两电极平行, 施以一个 $250 \text{ v}\cdot\text{mm}^{-1}$ 、 $10 \mu\text{s}$ 的直流电脉冲, 然后用培养液洗 3~5 遍后移入培养皿, 置于培养箱中平衡培养, 等待激活处理。

1.3.5 重构卵的激活 将融合后的重构卵平衡培养 30 min~1 h 进行镜下检查, 剔除死亡的重构卵子, 存活的重构卵用 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 离子霉素激活 4~5 min 后, 移入预先平衡好的含 $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-DMAP 的胚胎培养液中继续激活。

1.3.6 重构胚的培养 核移植重构胚胎 (即重构卵子完成激活) 在 $50 \mu\text{L}$ 的微滴中, 38.5°C , 5% CO_2 , 饱和湿度下培养。每滴培养液中培养 10 枚为宜, 培养液为 CR1aa。培养到 48 h 时检查卵裂率。

1.5 试验方案

1.5.1 重构卵的电融合前孵育 供体细胞注入去核的卵母细胞后, 分别移入成熟液中继续培养 30 min、

90 min、3~4 h 和 9~10 h 后再进行细胞电融合操作。统计电融合后的死亡率、48 h 后的卵裂率以及卵子利用率。

1.5.2 6-DMAP 的激活 重构卵用离子霉素激活后,再用 6-DMAP 分别处理 0、2、3、4、5 h 和 8~10 h,对重构卵进行激活。各组在 48 h 后统计卵裂率。

1.6 统计分析

实验中所用的结果均用 *t* 检验进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同孵育时间对重构胚发育的影响

重构卵在电融合操作前于成熟培养液中分别培养 30 min、90 min、3~4 h 和 9~10 h 后进行电融

合。结果显示,孵育 9~10 h 组和 3~4 h 组重构卵的融合后死亡率(分别 27.42%和 31.25%)显著低于 30 min 和 90 min 组(49.26%和 56.30%)($P<0.05$);平衡 9~10 h 的重构胚卵裂率(68.15%)显著高于 30 min 和 90 min 组(55.60%和 54.24%)($P<0.05$);9~10 h 组卵子的利用率(49.46%)显著高于 30 min 和 90 min 组(28.21%和 23.70%)($P<0.05$) (表 1)。

2.2 6-DMAP 激活时间对重构胚卵裂率的影响

经电融合后获得的重构卵先用离子霉素激活 4~5 min,再移入含 6-DMAP 的培养液中进一步激活。结果发现,用 6-DMAP 激活处理的胚胎各组间的卵裂率无显著性差异($P>0.05$),但均显著高于对照组($P<0.05$) (表 2)。

表 1 孵育时间对重构胚发育的影响

Table 1 Effects of incubation time on the development of reconstructed embryos

孵育时间 Incubation time	融合后死亡率/% Mortality of post-electrofusion	卵裂率/% Rate of cleavage	卵子利用率/% Rate of available oocyte
30 min	49.26 (234/475) ^a	55.60 (134/241) ^a	28.21 (134/475) ^a
90 min	56.30 (76/135) ^a	54.24 (32/59) ^a	23.70 (32/135) ^a
3~4 h	31.25 (20/64) ^b	52.27 (23/44) ^{ab}	35.94 (23/64) ^{ab}
9~10 h	27.42 (51/186) ^b	68.15 (92/135) ^b	49.46 (92/186) ^b

注:卵裂率,卵裂数/培养胚胎总数;卵子利用率,卵裂胚胎数/融合操作重构卵数。a, b, c: 同栏中不同字母表示差异显著($P<0.05$)。下同。

Notes: Rate of cleavage, number of cleavage /total of embryo; Rate of available oocyte, number of cleavage/total of fusional reconstructed oocyte. a, b, c: Values in the same column with different superscripts are different significantly($P<0.05$). The same below.

表 2 6-DMAP 激活时间对重构胚卵裂率的影响

Table 2 Effects of activation time of 6-DMAP on cleavage rate of reconstructed embryos

6-DMAP 激活时间/h Activaton time of 6-DMAP	激活处理的 重构卵数 No. of activated reconstructed oocytes	卵裂率/% Rate of cleavage
0	43	34.88 (15/43) ^a
2	61	59.02 (36/61) ^b
3	64	54.69 (35/64) ^b
4	174	59.2 (103/174) ^b
5	42	59.52 (25/42) ^b
8~10	115	57.39 (66/115) ^b

3 讨论

3.1 电融合前孵育时间对核移植重构卵的影响

在试验的前期发现,按正常的核移植操作过程进行核移植时,在细胞电融合时重构卵的死亡率非常的高(50%左右),这样势必造成核移植总效率的降低。我们推测主要原因可能是显微操作时卵母细胞的核虽然已经成熟(第一极体排出),但是此时的部分卵母细胞胞质并没有得到充分的成熟,这些胞质未能成熟的卵母细胞,电击承受能力可能较低,更容易因为电击造成卵母细胞裂解而死亡,所以在

重构操作结束后将重构卵放入培养液中继续培养以期获得卵母细胞胞质的进一步成熟而增加卵母细胞的电击承受力,从而降低电融合时的融合死亡率。试验结果表明,在核移植后将重构卵再孵育 3~4 h,重构卵在融合时的死亡率降到了 31.25%,显著低于孵育 30 min 和 90 min 组的死亡率;孵育 9~10 h 后融合死亡率进一步降到 27.42%,这一结果初步证实了试验的前期推测。试验中,孵育 9~10 h 组的核移植重构胚卵裂率为 68.15%,显著高于 30 min 和 90 min 组,但与 3~4 h 组相比差异不显著,原因可能为试验中 3~4 h 组处理的样本数较少造成的。Web 等认为,随着卵母细胞成熟时间的延长和卵母细胞胞质的老化,维持减数分裂阻滞的物质的降解,卵母细胞就越易被活化^[10]。目前研究的结果表明卵母细胞成熟到 28~30 h 进行激活,获得的卵裂率和囊胚率最高^[11-12]。本研究的结果也间接证明了卵母细胞的活化率与卵龄有关。统计卵子利用率时,我们发现继续培养 9~10 h 组的卵子利用率为 49.5%,显著高于 30 min 和 90 min 组,与 3~4 h 组虽未达到差异显著,其原因可能是后者样本数少造成。总之,本研究结果充分表明,在核移植操作时,在电

融合前对重构卵进行继续培养有利于降低融合时的死亡率, 提高核移植的总效率。

3.2 6-DMAP 激活时间对重构胚胎卵裂率的影响

有研究发现, 卵母细胞内游离钙离子浓度的变化在卵母细胞受精激活和人工激活过程中起重要的作用^[13-15]。离子霉素(ionomycin)是一种高效的化学激活剂, 在卵母细胞激活时可以动员卵母细胞内的钙离子来触发钙离子内流, 形成钙震荡, 从而启动卵母细胞的活化^[16-17]。但是, 单独使用离子霉素并不能很好的活化卵母细胞。有研究发现单独使用离子霉素不能使激活的卵母细胞形成原核^[18]。本实验中单独使用离子霉素激活仅得到 35% 的核移植胚胎卵裂率, 显著低于联合使用 6-DMAP 组, 试验结果与已报道的研究结果一致^[11]。单独使用离子霉素激活卵母细胞后, 成熟促进因子(MPF)水平下降一段时间后, 由于蛋白质合成和特殊蛋白磷酸化的作用, 水平又会升高, 所以难以获得较好的激活效果。但如果在激活时联合使用蛋白酶抑制剂 6-DMAP 就能够有效的抑制蛋白质合成和磷酸化而抑制 MPF 和细胞静止因子(CSF)的活性, 同时抑制了第二极体的排放, 启动有丝分裂和加速原核的形成, 进一步改善卵母细胞的激活效果。本研究结果证实这一点, 结果充分显示离子霉素与 6-DMAP 联合使用的激活效果要显著好于离子霉素的单独使用且激活效果稳定, 试验结果与已有报道一致^[6,12,19]。目前, 对于 6-DMAP 作用时间的研究缺少详细报道, 本试验对此进行了探讨。试验结果显示, 山羊核移植胚胎用离子霉素激活后, 再用 6-DMAP 激活 2~5 h 甚至 8~10 h 后, 48 h 后的核移植胚胎卵裂率, 各组间没有显著性的差异, 均接近 60%。有研究在对牛卵母细胞孤雌激活的研究中发现, 用 6-DMAP 处理牛卵母细胞 4 h、6 h 和 8 h 后, 胚胎的卵裂率和囊胚率均没有显著性的差异, 但卵裂率与囊胚率均显著的高于 2 h 组^[20]。这一结果与本试验的结果有细微差别, 其原因可能在于所处理的卵母细胞质量和试验对象有差异造成。本研究结果表明, 6-DMAP 作用 2~10 h 后, 核移植胚胎的早期卵裂率没有表现出明显差异, 其对胚胎的早期卵裂发育作用可能有限, 它的影响可能更多的在于胚胎的后期发育上。

参考文献:

- [1] 赵晓娥, 李向臣, 高立功, 等. 山羊卵母细胞的体外成熟研究[J]. 中国农学通报, 2005, 21(9): 1-3.
- [2] 孙桂金, 尹逊河, 敖红. 绵羊卵母细胞体外成熟的研究[J]. 中国草食动物, 2006, 26(5): 14-16.
- [3] Pincus G, Enzman E V. The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro* [J]. J Exp Med, 1935, 62: 665-670.
- [4] Combelles C M H, Cekleniak N A, Racowsky C, et al. Assessment of nuclear and cytoplasmic maturation in in-vitro matured human oocytes [J]. Hum Reprod, 2002, 17(4): 1006-1016.
- [5] Thibault C, Szollosi D, Gerrard M. Mammalian oocyte maturation [J]. Reprod Nutr Dev, 1987, 27: 865-896.
- [6] 张晓建, 海里且木, 孙玉红, 等. 不同化学激活方法对绵羊孤雌生殖胚体外发育的影响[J]. 黑龙江动物繁殖, 2005, 13(1): 8-10.
- [7] 田见晖, 蔡元, 刘国世, 等. 化学激活对猪体外成熟卵母细胞孤雌发育的影响[J]. 中国农业科学, 2005, 38(5): 1029-1033.
- [8] 卢晟盛, 魏凤, 房慧伶, 等. 不同化学激活方法和电激活参数对猪体外成熟卵母细胞早期孤雌发育的影响[J]. 广西农业生物科学, 2006, 25(S1): 184-185.
- [9] 张运海, 章孝荣, 刘亚, 等. 波尔山羊及黄牛耳部成纤维细胞的体外培养[J]. 安徽农业大学学报, 2002, 29(4): 387-390.
- [10] Webb M, Howlett S K, Maro B. Parthenogenesis and cytoskeletal organization in ageing mouse eggs [J]. J Embryo Exp Morphol, 1986, 95: 131-145.
- [11] 敖红, 王海, 连正兴, 等. 不同化学激活方法对山羊卵母细胞激活效果的研究[J]. 中国农业大学学报, 2003, 8(5): 18-20.
- [12] 张绣, 李裕强, 张涌, 等. 体外成熟对牛卵母细胞孤雌激活后发育潜力的影响[J]. 黄牛杂志, 2004, 30(1): 13-16.
- [13] Kline D, Kline J T. Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg [J]. Dev Biol, 1992, 149: 80-89.
- [14] Miyazaki S, Shirakawa H, Nakada K, et al. Essential role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/ Ca^{2+} release channel in Ca^{2+} waves and Ca^{2+} oscillations at fertilization of mammalian eggs[J]. Dev Biol, 1993, 158: 62-78.
- [15] Swann K. Soluble sperm factors and Ca^{2+} release in eggs at fertilization [J]. Rev Reprod, 1996, 1: 33-39.
- [16] Morgan A, Jacob R. Ionomycin enhanced Ca^{2+} influx by stimulating store-regulated cation entry and not by a direct action at the plasma membrane[J]. Biochem J, 1994, 300: 665-672.
- [17] Jones K T, Carroll J, Whittingham D G. Ionomycin, thapsigargin, ryanodine, and sperm induced Ca^{2+} release increase during meiotic maturation of mouse oocytes [J]. J Biol Chem, 1996a, 270: 6671-6677.
- [18] Susko-Parrish J L, Rutledge-Leibfried M L. Inhibition of protein kinases after an induced calcium transient causes transition of bovine oocyte to embryonic cycles without meiotic completion [J]. Dev Biol, 1994, 166: 729-739.
- [19] 李雪峰, 李煜, 郭继彤, 等. 不同激活方法对牛体细胞核移植胚胎体外发育的影响[J]. 实验生物学报, 2002, 35(3): 239-242.
- [20] 张琇. 牛卵母细胞孤雌激活与体外受精[D]. 杨陵: 西北农林科技大学, 2002.