

μm filters, and then ultrafiltrated and concentrated by Diaflo YM-10, so the fraction of molecular weight(MW) > 10 KD from FCGM was obtained. FCGM of MW > 10 KD was separated by gel filtration through Sephadex G75 column at 4°C . Two fractions of peak I and II were collected and bioassayed respectively. The fraction I was identified to possessed cardiotropic activity. Above mentioned biologically active fraction I was dialysed, concentrated, and then further purified by high performance liquid chromatography(HPLC). The five elutions of Peak were obtained and the first fraction was identified to be of biological activity. The elution of peak I, which was dialysed and concentrated, was applied to the high performance liquid chromatography column again, Protein peak was detected and gained only one elution peak. Elution protein of peak I of HPLC was analysed by SDS-PAGE. Contrast to the standard proteins, several substances were found in the one elution peak and their MWs were between 25 – 35 KD.

Key words: Cardiomyocytes Fibroblasts [^3H]-Leu MTT Sephadex G-75 gel filtration High pressure liquid chromatography (HPLC)

不同因素对大鼠卵母细胞孤雌激活作用影响的研究

谭 信^{*,**3} 李光鹏^{*} 孙青原^{*} 廉 莉^{*} 王永潮^{**2} 陈大元^{*1}

(^{*} 中国科学院动物研究所生殖生物学国家重点实验室 北京 100080

^{**} 北京师范大学细胞增殖与调控生物学教育部重点实验室 北京 100875)

卵母细胞激活研究是发育生物学的一项基本课题。研究不同理化因素对卵母细胞的激活作用和过程既有利于对诸如激活过程的信号偶联过程、激活动力学、细胞周期阻滞的恢复等生理机制的深入了解,也有利于解决胚胎细胞核移植过程中卵母细胞的激活这一关键问题。目前已知,机械、温度、渗透压及电刺激等物理因素以及酶、氢离子、二价阳离子、钙离子载体、乙醇、蛋白质合成抑制剂等化学因素均能有效激活卵母细胞^[1,2]。这些因素涉及到许多不同的激活机理。其中细胞内钙离子浓度及其变化样式对激活过程起到关键的作用^[3],由蛋白质合成抑制所引起的细胞静止因子(CSF)的某些组分缺乏也是影响卵母细胞激活的一个因素^[4]。目前对卵母细胞激活虽然已有一些研究,但对大鼠卵母细胞孤雌激活的研究却很少且缺乏系统性^[5,6]。本实验研究了电激、乙醇、蛋白质合成抑制剂放线菌酮(cycloheximide, CHX)、二价阳离子氯化锶(SrCl_2)等因素对大鼠卵母细胞的激活作用,以及卵龄和卵丘细胞对大鼠卵母细胞孤雌激活的影响,为哺乳动物孤雌生殖的研究和提高胚胎细胞核移植的成功率提供参考依据。

材料和方法

1. 卵母细胞的获得

对4周龄SD大鼠进行光控饲养(6:00–20:00光照;20:00–6:00黑暗)。腹腔注射PMSG 20IU/只,48–54小时后腹腔注射hCG 20IU/只。于次日按hCG注射后所需时间处死动物,取输卵管。于M2培养液中划破输卵管壶腹

部,将卵丘—卵母细胞复合体(COC)轻轻挤出。用透明质酸酶(300IU/ml溶于M2培养液中)去除卵丘细胞。再经M2培养液洗涤3次以上后进行激活处理或体外培养。一部分COC不经透明质酸酶处理直接进行激活或体外培养。

2. 激活前后的体外培养

COC或去除卵丘细胞的卵母细胞于激活处理后在添加4mg/ml牛血清白蛋白(BSA)的DMEM培养液(DMEM/BSA)中培养8小时后进行激活鉴定。部分实验中COC或去除卵丘细胞的卵母细胞于激活前在上述培养液中先培养一段时间再行激活。

3. 激活处理

(1) SrCl_2 先用0.9%生理盐水将 SrCl_2 配制成16mmol/L和30mmol/L的贮存液,使用前加入无钙M2培养液稀释到所需浓度^[7]。以不同时间,不同浓度激活处理卵母细胞或COC,用无钙M2培养液洗涤4至5次后培养观察。

(2) 乙醇 用M2培养液将无水乙醇稀释至8%浓度,激活处理卵母细胞或COC 8分钟,用M2培养液洗涤4至5次后转入培养液进行培养并观察。

(3) 电刺激 取去除卵丘细胞的卵母细胞,先用无钙M2培养液洗涤一次,再移至电融合液(0.3 mol/L甘露醇,0.1 mmol/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05mmol/L CaCl_2)中。吹吸数次使其沉入溶液底部。取自制电融合板,在相距1.2mm的电极丝之间滴上电融合液,将卵母细胞置于其中。给予一定强度的电刺激后,用无钙M2培养液洗涤3至4次后培养观

本文2000年8月29日收到,2001年3月19日接受。

致谢:本文由预攀登计划(编号:970211019-2)及中国国家重大基础研究项目(G1999053901)资助。

^{*1}第一联系人。 ^{**2}第二联系人。 ^{*,**3}现工作单位:首都医科大学

察。

(4) 放线菌酮 将经过其他方法激活处理或未处理的卵母细胞置于含 $5\mu\text{g/ml}$ CHX 的 DMEM/BSA 培养液中培养 8 小时后观察。

4. 激活鉴定

将卵细胞中出现原核和极体或 2-细胞各有一个细胞核判定为激活^[8]。卵质膜破裂者判定为死亡。胞质分裂一次或多次但不出现原核者判定为碎裂,将其划归为未激活。

5. 数据分析

实验数据经 χ^2 检验进行统计学处理。

结 果

1. 体外培养对 SD 大鼠卵母细胞激活的影响

取注射 hCG 17 小时卵母细胞,于离体后培养 0 小时、2 小时、4 小时后分别用 1.6 mmol/L SrCl_2 处

理 10 分钟和 8% 乙醇处理 8 分钟;并分别以无钙和有钙 M2 培养液处理作为对照。另取 hCG 注射 15 小时卵母细胞,培养 2 小时后用 1.6 mmol/L SrCl_2 处理 10 分钟或用 8% 乙醇处理 8 分钟。以无钙和有钙 M2 培养液处理作为对照。结果表明:hCG 注射 17 小时未经培养的卵母细胞 SrCl_2 和乙醇的激活率分别仅有 3.33% 和 8.75% (表 1),而 hCG 注射后同样时间但经体外培养 2 小时的卵母细胞可被 SrCl_2 或乙醇明显激活。各组激活率均随 hCG 注射后卵龄的增加而增加(表 1)。对照组卵母细胞激活率为零。离体后培养 0 小时的卵母细胞经 SrCl_2 或乙醇处理后的激活率与对照组无显著差异 ($P > 0.05$)。各组死亡率也无显著差异 ($P > 0.05$)。

表 1 体外培养对 SD 大鼠卵母细胞激活的影响

处死动物时间 (注射 hCG 后 hr)	体外培养时间 (hr)	1.6mmol/L SrCl_2 的激活效率		8% 乙醇的激活效率	
		激活率 (%)	死亡率 (%)	激活率 (%)	死亡率 (%)
17	0	2/60(3.33) ^a	0	7/80(8.75) ^a	0
15	2	40/78(51.28) ^b	1/78(1.28)	27/76(35.53) ^e	1/76(1.32)
17	2	59/72(81.94) ^c	0	30/69(43.48) ^f	0
17	4	55/65(84.62) ^d	2/65(3.08)	56/80(70.00) ^g	2/80(2.50)

a:b,c,d,e,f,g;b:f;c,d;e,f:g = $P < 0.01$ 。b:e 和 d:g = $P < 0.05$ 。

表 2 卵丘细胞对卵母细胞激活的影响

卵的类型	1.6mmol/L SrCl_2 的激活效率		8% 乙醇的激活效率	
	激活率 (%)	死亡率 (%)	激活率 (%)	死亡率 (%)
COC	10/86(11.63) ^a	0	3/81(3.70) ^a	1/81(1.23)
卵母细胞	56/66(84.95) ^b	1/66(1.52)	31/73(42.47) ^c	0

a,c:b 和 a:c = $P < 0.01$ 。

2. 卵丘细胞对卵母细胞激活的影响

取 hCG 处理 16 小时的 COC,其中一部分去除卵丘细胞。两者于 DMEM/BSA 中培养 2 小时后,分别用 1.6 mmol/L SrCl_2 处理 10 分钟和 8% 乙醇处理 8 分钟,并分别以无钙和有钙 M2 培养液处理作为对照。继续培养 8 小时后观察。观察前将 COC 中的卵丘细胞用透明质酸酶去除。结果表明,去卵丘细胞后的激活率明显升高,而 COC 中的卵母细胞激活率很低(表 2)。对照组卵母细胞无一激活。各组死亡率无明显差异 ($P > 0.05$)。

3. SrCl_2 对 SD 大鼠卵母细胞激活的影响

(1) 不同浓度 SrCl_2 对激活效率的影响 取

hCG 处理 18 小时并经体外培养 2 小时的卵母细胞用 0.8、1.6、3.2、5 mmol/L 的 SrCl_2 处理 10 分钟。以无钙 M2 培养液处理作为对照。结果 1.6 和 3.2 mmol/L SrCl_2 处理可得到较高的激活率,彼此之间无显著差异;0.8 和 5 mmol/L 浓度组激活率次之(表 3)。

(2) SrCl_2 处理不同时间对激活效率的影响

取注射 hCG 后 19 小时并经体外培养 2 小时的卵母细胞,用 1.6 mmol/L SrCl_2 分别处理 5、10、20、30 分钟。以无钙 M2 培养液处理作为对照。结果表明,除 5 分钟处理组外 ($P < 0.01$),其余各组激活率基本一致(表 4),均有较高激活率。

卵龄,体外培养和卵丘细胞的存在对 SrCl_2 激

活 SD 大鼠卵母细胞的影响参见结果 1 和 2(表 1 和表 2)。

表 3 不同浓度 SrCl_2 对激活效率的影响

SrCl_2 浓度 (mmol/L)	注射 hCG 后 hr	激活率(%)	死亡率(%)
0	18	0 ^a	0 ^a
0.8	18	28/68(41.18) ^b	1/68(1.47)
1.6	18	56/66(84.85) ^c	1/66(1.52)
3.2	18	70/81(86.41) ^c	4/81(4.94) ^d
5	18	45/80(56.25) ^b	2/80(2.50)

a:b,c 和 b:c = $P < 0.01$ 。a:d = $P < 0.05$ 。

表 4 1.6mmol/L SrCl_2 处理不同时间对激活效率的影响

作用时间 (min)	注射 hCG 后 hr	激活率(%)	死亡率(%)
0	19	0 ^a	1/41(2.44) ^a
5	19	44/62(70.97) ^b	0 ^a
10	19	69/74(93.24) ^c	0 ^a
20	19	83/90(92.22) ^c	2/90(2.22) ^a
30	19	48/52(92.31) ^c	1/52(1.92) ^a

a:b,c 和 b:c = $P < 0.01$ 。

4. 电刺激对 SD 大鼠卵母细胞激活的影响

取 hCG 后 19 小时并经体外培养 2 小时的卵母细胞,分别以 140V, 160V 和 200V 电压, 80 微秒(μs)的强度刺激卵母细胞,结果表明在 160V, 80 μs 的强度下可得到较高的激活率(表 5)。

表 5 电刺激对 SD 大鼠卵母细胞激活的影响

电刺激强度	注射 hCG 后 hr	激活率(%)	死亡率(%)
0V, 0s	19	0 ^a	0 ^a
140V, 80 μs	19	68/99(68.69) ^c	5/99(5.05) ^a
160V, 80 μs	19	67/78(85.90) ^d	4/78(5.13) ^a
200V, 80 μs	19	31/69(44.93) ^b	22/69(31.88) ^e

a:b,c,d,e; b:c; c:d = $P < 0.01$ 。

5. CHX 与其他不同激活因素联合作用对 SD 大鼠卵母细胞激活的影响

取注射 hCG 后 18 小时且体外培养 2 小时卵母细胞,分别给予 160V, 80 μs 电刺激; 8% 乙醇处理 8 分钟; 1.6mmol/L SrCl_2 处理 10 分钟; 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CHX 处理 8 小时。部分经电刺激、乙醇、 SrCl_2 处理过的卵母细胞再分别用 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CHX 处理 8 小时。结果

发现 SrCl_2 与 CHX 联合作用较它们分别作用可明显提高激活率($P < 0.05$, 表 6)。

表 6 CHX 与其他方法联合作用对 SD 大鼠卵母细胞激活的影响

处理方法	注射 hCG 后 hr	激活率(%)	死亡率(%)
电刺激	18	50/82(59.52) ^a	5/82(6.10) ^a
SrCl_2	18	56/66(84.85) ^b	1/66(1.52)
CHX	18	60/76(78.95) ^c	0 ^c
CHX	19	68/74(91.89) ^f	0 ^c
8% 乙醇	18	31/73(42.47) ^d	0 ^c
SrCl_2 + CHX	18	73/77(94.81) ^e	0 ^c
电刺激 + CHX	18	59/74(79.73) ^c	6/74(8.11) ^a
8% 乙醇 + CHX	18	68/78(87.18) ^b	2/78(2.56)

a:b 和 b,c:d = $P < 0.01$ 。a:c,d; b:e; c:f = $P < 0.05$ 。

讨 论

已有研究证明,乙醇、 SrCl_2 、CHX 和 PMA(豆蔻酰佛波酯乙酯)能够有效地使小鼠卵母细胞激活^[1]。但当用这些因素分别单独刺激时,均不能使中国仓鼠卵母细胞激活^[18]。本研究中,乙醇、 SrCl_2 、CHX 和电刺激均可激活 SD 大鼠卵母细胞,其中 SrCl_2 、CHX 和电刺激的效果较乙醇好。这说明小鼠和 SD 大鼠卵母细胞较中国仓鼠的卵母细胞容易激活。

卵母细胞能否激活与其所处的细胞周期时相有关,Zernicka-Goetz 发现用 Chloral hydrate 激活不同减数分裂时相大鼠卵母细胞的效率有明显差异^[6]。对小鼠的研究也发现对卵母细胞的激活能力与卵龄有关^[8,9]。我们的观察发现,刚离体的卵母细胞经 SrCl_2 和乙醇处理后,激活率分别只有 3.33% 和 8.75%。如经体外培养 2 小时和 4 小时,再经 SrCl_2 处理,则激活率分别达到 81.94% 和 84.62% (表 1)。这些结果可能意味着卵母细胞激活率与其所处的细胞周期密切相关。

本研究提示体外 SD 大鼠的孤雌激活条件与体内精子激活机制可能不同。估计卵丘细胞有保护卵母细胞免受精子之外各种因素激活的作用。在牛卵母细胞孤雌激活中也有类似情况^[10]。

SrCl_2 对小鼠卵母细胞有很好的激活作用^[7,11],但对于大鼠的激活效果如何尚未见报道。据认为

Sr^{2+} 作为二价阳离子,有可能取代 Ca^{2+} 而通过钙泵进入细胞,造成 Ca^{2+} 的多次升高,导致卵母细胞的激活^[12]。本研究通过对不同浓度,不同时间 SrCl_2 的作用,得出当浓度为 1.6 或 3.2 mmol/L,作用时间为 10 至 30 分钟时均有较高的激活效率。这与在小鼠中得到的结果相似^[7,11]。

一些研究表明,不同孤雌激活因素联合作用有可能提高激活效率^[3,13-16]。本研究比较了几种因素与 CHX 依次作用的效果。发现 CHX 与 SrCl_2 联合作用时,可以明显提高卵母细胞的激活率。这可能与它们的作用点不同有关。 SrCl_2 可导致细胞内钙离子的变化,并通过钙离子的升高来灭活 CSF^[17]。而 CHX 则是蛋白质合成的抑制剂,可抑制 Mos 的合成,而 Mos 是 CSF 的一个关键组分^[4]。这两类因素通过不同的作用方式抑制 CSF 来激活卵母细胞,彼此可以协同作用。

摘 要

本实验比较了 SrCl_2 , 放线菌酮(CHX), 电刺激和乙醇等理化因素对 SD 大鼠卵母细胞激活的作用。结果表明, SrCl_2 , CHX 和电刺激均能有效激活 SD 大鼠卵母细胞,其最高激活率分别达到 93.24%, 91.89% 和 85.90%。8% 乙醇对注射 hCG 21 小时后的卵母细胞激活率也达 70%。 SrCl_2 在 1.6 和 3.2 mmol/L 浓度,作用 10 - 30 分钟均有较好激活效果。电刺激强度在 160V, 80 μs 作用较佳。当 SrCl_2 与 CHX 联合作用时,激活率可有明显提高。但电刺激或乙醇与 CHX 的联合作用不能有效提高激活

率。本研究还比较了卵丘细胞的存在与否对激活的影响,发现卵丘-卵母细胞复合体中的卵母细胞不能被有效激活。刚离体的超排卵母细胞也不能被有效激活,须在体外培养一定时间后才能被激活。

关键词:孤雌激活 大鼠 卵母细胞 SrCl_2 放线菌酮 电激活 乙醇

参 考 文 献

- [1] Kaufman, M. H., 1983, Early Mammalian Development Parthenogenetic Studies, Cambridge University Press.
- [2] Dyban, A. P. and Noniashvili, E. M., 1986, *Ontogenez*, 17 (4): 368 - 388.
- [3] Presicce, G. A. and Yang, X., 1994, *Mol. Reprod. Dev.*, 38: 380 - 385.
- [4] Hashimoto, N. et al., 1994, *Nature*, 370(6488): 391.
- [5] Zernicka-Goetz, M. et al., 1993, *Int. J. Dev. Biol.*, 37 (2): 273 - 277.
- [6] Zernicka-Goetz, M., 1991, *Mol. Reprod. Dev.*, 28 (2): 169 - 176.
- [7] 李光鹏等, 1998, 细胞生物学杂志, 20(2): 92 - 95.
- [8] 谭景和等, 1995, 动物学报, 41(3): 327 - 331.
- [9] 谭景和等, 1988, 细胞生物学杂志, 10: 69 - 72.
- [10] Chian, R. C. and Sirard, M. A., 1995, *Mol. Reprod. Dev.*, 42(4): 425 - 431.
- [11] O'Neill, G. t. et al., 1991, *Mol. Reprod. Dev.*, 30: 214 - 219.
- [12] Kline, D. and Kline, J. J., 1992, *Dev. Biol.*, 149: 80 - 89.
- [13] Petr, J. et al., 1996, *Theriogenology*, 45: 1473 - 1478.
- [14] Loi, P. et al., 1998, *Biol. Reprod.*, 58(5): 1177 - 1187.
- [15] Liu, L. et al., 1998, *Mol. Reprod. Dev.*, 49 (3): 298 - 307.
- [16] Tateno, H. and Kamiguchi, Y., 1997, *Mol. Reprod. Dev.*, 47(1): 72 - 78.
- [17] Bos-Mikich, K. et al., 1995, *Mol. Reprod. Dev.*, 41: 84 - 90.

THE COMPARATIVE STUDIES ON THE EFFECTS ON PARTHENOGENETIC ACTIVATION OF RAT OOCYTES

TAN Xin*, ** LI Guang Peng* SUN Qing Yuan* LIAN Li* WANG Yong Chao** CHEN Da Yuan*

(* State Key Laboratory of Reproductive Biology Institute of Zoology Academia Sinica Beijing 100080 and

** Education Ministry Key Laboratory of Cell Proliferation and Regulation Biology Beijing Normal University Beijing 100875)

ABSTRACT

The experiment was conducted to compare the effects of SrCl_2 , cycloheximide(CHX), electronic stimulation and alcohol on parthenogenetic activation of SD rat oocytes. The results indicated that SrCl_2 , CHX and electronic stimulation might effectively activate oocytes of SD rats. The best activation percentages were 93.24%, 91.89% and 85.90%, respectively. The activation rate of 8% alcohol in the oocytes collected 21 hours post hCG injection was 70%. SrCl_2 treatment for 10 to 30 minutes at concentration of 1.6 or 3.2 mmol/L would get best result. The best result of electronic stimulation would obtain when the strength was 160V, 80 μs . The activation rate was increased further when oocytes were cultured in the medium supplemented with CHX after stimulated by SrCl_2 , but the activation rate was not increased further when the oocytes were treated with CHX after stimulated by electronic stimulation or alcohol. Additionally, we found that the oocytes both in COC or just obtained from ovaries could not be activated effectively, as compared with denuded oocytes.

Key words: Parthenogenetic activation Rat Oocyte SrCl_2 Cycloheximide Electronic stimulation Alcohol