

不同年龄昆明白小鼠卵母细胞的生发泡互换

崔龙波^① 周雪莹^① 王敏强^① 黄秀英^② 孙方臻^②

(^①烟台大学生物化学系 烟台 264005; ^②中国科学院遗传与发育生物学研究所 北京 100080)

摘要:为探讨卵母细胞减数分裂异常及其与年龄相关变化之间的关系,对不同年龄段昆明白小鼠卵母细胞进行了生发泡(GV)移植研究。应用显微操作和电融合技术,将6~8周龄小鼠GV期卵母细胞分别与6月龄、9月龄和12月龄小鼠GV期卵母细胞进行GV互换,所形成的6种GV-胞质体复合体的融合率(89.7%~95.6%)和6种重组卵母细胞的成熟率(83.5%~88.2%)并不因小鼠年龄的改变而有所变化。成熟的6种重组卵母细胞经体外受精后,形成原核期胚和2-细胞期胚的比率(分别为80.0%~87.3%和42.7%~50.9%)并不因不同年龄小鼠卵母细胞GV互换所带来的细胞质或细胞核的改变而受到影响。

关键词:小鼠;年龄;卵母细胞;生发泡;核移植

中图分类号:Q419 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2005)06-38-06

Germinal Vesicle Exchange among Oocytes from KM Mice at Different Ages

CUI Long-Bo^① ZHOU Xue-Ying^① WANG Min-Qiang^① HUANG Xiu-Ying^② SUN Fang-Zhen^②

(^①Department of Biochemistry, Yantai University, Yantai 264005;

^②Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: To investigate meiotic abnormality of oocytes and relationship between the abnormality and maternal age, germinal vesicle (GV) transfer was carried between GV oocytes from KM mice of different ages. Using micromanipulation and electrofusion procedures, GV's were exchanged between 6-8-week-old mice and 6-month-old mice, 9-month-old mice, 12-month-old mice, respectively. Electrofusion rates (89.7% - 95.6%) were equivalent among 6 types of GV-cytoplasm complexes constructed by GV exchange, and maturation rates (83.5% - 88.2%) were not different among 6 types of the reconstructed GV oocytes. After *in vitro* maturation and fertilization of 6 types of the reconstructed oocytes, percentages of pronuclear-stage (80.0% - 87.3%) and 2-cell embryos (42.7% - 50.9%) were not different, suggesting that early embryo development is not influenced by cytoplasmic or nuclear changes among oocytes from mice of different ages.

Key words: Mouse; Age; Oocyte; Germinal vesicle; Nuclear transfer

在自然人口中,随女性年龄的增长,出现与生育力明显倒置的关系。当女性年龄超过40岁时,妊娠率明显降低,这与胚胎着床率下降相平行。妊娠率和着床率下降似乎与老龄妇女卵母细胞染色体非整倍性的发生上升有关^[1]。染色体分离异常起源于卵母细胞成熟后期的第一次和/或第二次减数分裂异常^[2]。在动物卵母细胞,核基因组与细胞质内无数的因子相互作

用影响着减数分裂——染色体数由GV期的4N降为M II期的2N。应用显微操作和电融合技术,可以将生发泡(GV)移植到另一个同一发育时期的去核供体卵母细胞(胞质体)中,从而重

基金项目:国家973项目(No. G1999055902)资助;

第一作者介绍:崔龙波,男,博士,教授;研究方向:发育生物学和细胞生物学;E-mail: lbctui@163.com。

收稿日期:2005-02-10;修回日期:2005-07-21

组一个 GV 期卵母细胞^[3-6]。因此 GV 移植是一种研究哺乳动物卵母细胞成熟过程期间细胞核与细胞质之间相互作用的有效技术。昆明白小鼠是我国特有且使用得最广泛的小鼠品系, 我们的研究工作表明, 昆明白小鼠呈现与衰老相关的生育力下降, 主要表现在卵母细胞减数分裂的异常。本研究在年轻小鼠卵母细胞与中年和老年小鼠卵母细胞之间进行 GV 互换, 目的在于通过 GV 移植所建立起的重组 GV 期卵母细胞, 可以提供一个有价值的细胞模型——研究卵母细胞减数分裂异常及其与年龄相关变化之间的关系。

1 材料与方 法

1.1 实验小鼠 昆明白小鼠由中国科学院遗传与发育生物学研究所实验动物中心提供。雌鼠分为 6~8 周龄、6 月龄、9 月龄和 12 月龄 4 个年龄段。雄鼠为 3~6 月龄。

1.2 GV 期卵母细胞收集 每只雌鼠腹腔注射 7.5 IU 的孕马血清促性腺激素(PMSG, 中国宁波激素制品厂) 46~48 h 后断颈处死小鼠, 取出卵巢, 用 5F 解剖针刺破卵泡, 释放出 GV 期卵母细胞, 用内径与卵母细胞直径相当的玻璃管反复吹打至颗粒细胞从卵母细胞上脱离。卵母细胞的收集均在 M_2 (Sigma, USA) 培养液中进行。

1.3 显微操作 显微操作在室温下进行, 所用仪器为 Leica 显微操作仪。实验所用固定管和移核管用毛细玻璃管 (Clark Electromedical Instruments, UK) 在拉针仪 (Sutter Instrument Co., USA) 上拉制而成, 固定管在微锻仪 (Narishige, Japan) 上于外径 80 μm 处断开, 并将断端烤钝而成, 移核管于内径 20 μm 处断开, 形成平头移核管, 切口针系用直径为 1.2 mm 的实心玻璃棒在拉针仪上直接拉制而成。

GV 互换过程如下: 在显微操作前, GV 期卵母细胞于含有 10% 胎牛血清和 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ IBMX (Sigma) 的 HTF (Irvine Scientific, USA) 培养液中,

37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱内孵育 2 h, 从而形成卵周隙。IBMX 的作用是抑制生发泡破裂 (GVBD)。将形成卵周隙的 GV 期卵母细胞转入含 10% 胎牛血清、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ IBMX 和 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 细胞松弛素 B (Sigma) 的 HEPES 缓冲的 HTF (Irvine Scientific, Irvine CA) 培养液中室温孵育 30 min。用切口针对卵母细胞的透明带进行切口, 然后用移核管从透明带切口处进入卵周隙并靠近 GV, 吸取由少量胞质包裹的 GV——GV 核体, 然后将 GV 核体转移到另一去除 GV 的 GV 期卵母细胞的卵周隙内, 形成 GV-胞质体复合体 (图 1~4)。用 HEPES 缓冲的 HTF 培养液洗涤 5 次 GV-胞质体复合体, 转入含 10% 胎牛血清的 HTF 液中于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱内恢复 30 min, 然后进行细胞融合。

1.4 细胞融合 细胞融合在电融仪 BTX200 (Genetronics Inc., USA) 上进行, 融合液为 M_2 培养液, 融合参数: 电场强度为 160 V/cm, 持续时间为 90 μs , 1 次电脉冲刺激。将单个的 GV-胞质体复合体移入两个微电极之间, 用针拨动使 GV 与胞质体之间接触面与电场方向垂直。电刺激后的 GV-胞质体复合体放入 M_2 培养液内, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱内培养, 30 min 后观察细胞融合情况。

1.5 重组卵母细胞的体外成熟和体外受精 融合后的重组卵移入到含 10% 胎牛血清的 HTF 培养液中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱内培养, 17~18 h 后观察重组卵的成熟情况, 取排放出第一极体的重组卵进行后述实验。

按 Hogan 等^[7]描述的方法对成熟的卵母细胞进行体外受精。从雄鼠的附睾尾收集精子, 并在含 15 mg/ml BSA (Sigma) 的 IVF 液中获能 1.5 h。在含 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA 的 IVF 液中将卵母细胞与精子一起孵育 6 h, 然后将卵母细胞移入含 10% 胎牛血清的 HTF 液中 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 体外培养 6 h 后通过原核出现与否检查激活情况, 第 2~3 d 检查发育到 2-细胞期胚情况。

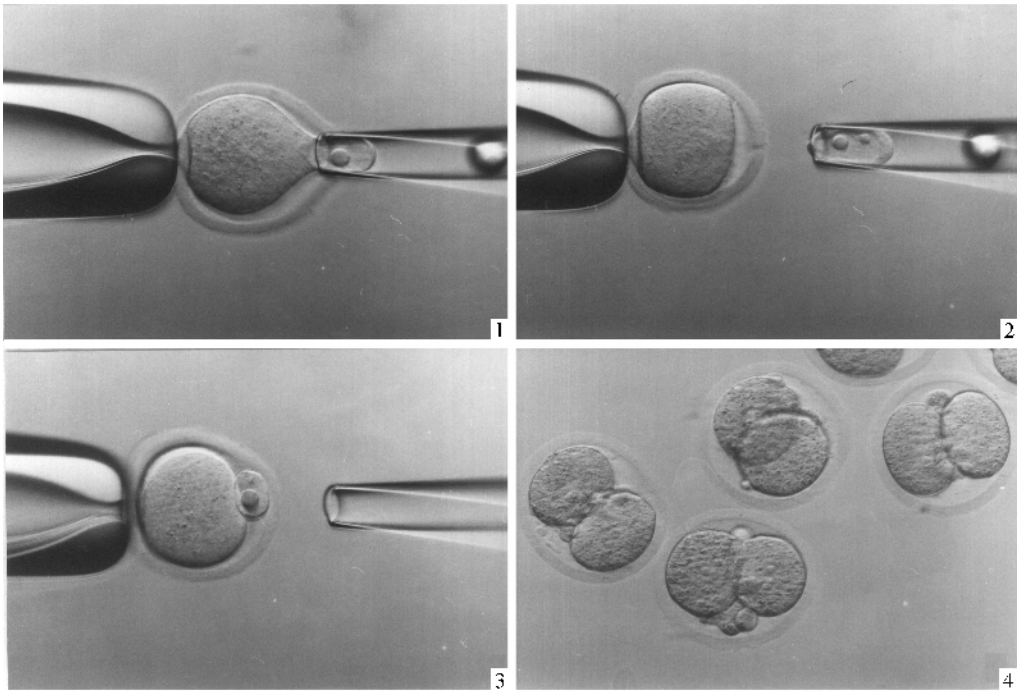


图1 吸入GV;图2 吸取GV;图3 将GV核体移入去GV后的卵母细胞中;
图4 12M GV-6W胞质重组后体外受精形成的2-细胞期胚(×400)

Fig.1 Aspiration of GV; Fig.2 Removal of GV;

Fig.3 Transfer of an isolated GV karyoplast into an enucleated GV oocyte;

Fig.4 2-cell embryos obtained by IVF of oocytes reconstructed by 12M GV-6W cytoplasm

1.6 数据统计分析 采用 χ^2 检验对实验数据进行统计学分析。

2 结果

2.1 GV-胞质体复合体的融合与成熟 在年轻小鼠与中年和老龄小鼠的GV期卵母细胞之间进行发泡互换,构成6组不同的GV-胞质体复合体。6~8周龄的GV与6月龄的胞质体(6W GV-6M胞质体),6~8周龄的胞质体与6月龄的GV(6W胞质体-6M GV),6~8周龄的GV与9月龄的胞质体(6W GV-9M胞质体),6~8周龄的胞质体与9月龄的GV(6W胞质体-9M GV),6~8周龄的GV与12月龄的胞质体(6W GV-12M胞质体),以及6~8周龄的胞质体与12月龄的GV(6W胞质体-12M GV)。每组重复实验5次以上。

经过电融合处理,6种GV-胞质体复合体的融合率全部在89%以上,6种GV-胞质体复合

体的融合率相互比较无显著差异(表1)。以排放出第一极体作为卵母细胞成熟的标志,在体外培养17~18h后,重组卵母细胞的成熟率在83.5%~88.2%之间,6种重组卵母细胞的成熟率之间相互比较以及与相应对照卵母细胞的成熟率(86.5%~89.2%)比较均无显著差异(表1)。

2.2 成熟的重组卵母细胞经体外受精后的发育 不同年龄小鼠的GV期卵母细胞在GV互换后,取成熟的重组卵母细胞经体外受精6h,发育到原核期胚和2-细胞期胚的情况见表2和图4。重组卵母细胞发育到原核期胚的比率在80.0%~87.3%之间,6种重组卵母细胞发育到原核期胚的比率相互比较无显著差异,与相应对照卵母细胞(82.6%~89.2%)比较亦无显著差异。重组卵母细胞发育到2-细胞期胚的比率在42.7%~50.9%之间,6种重组卵母细胞发育到2-细胞期胚的比率相互比较无显著差异,

与相应对照卵母细胞(44.9% ~ 50.6%)比较亦无显著差异(表 2)。包括实验组和对照组的所

有卵母细胞只有极少数发育到 3-细胞期胚或 4-细胞期胚(2.4% ~ 5.8%)之后停止发育。

表 1 不同年龄小鼠 GV 期卵母细胞 GV 互换后的细胞融合与体外成熟

Table 1 Cell fusion and *in vitro* maturation of oocytes reconstructed by GV exchange among oocytes from mice of different ages

GV-胞质体复合体类型 Types of GV-cytoplasmic complexes	重复次数 No. of replicates	实验卵数 No. of oocytes analyzed	细胞融合数 No. of oocytes fused (%)	成熟到 M II 期数 No. of oocytes matured (%)
6 周龄 GV-6 月龄胞质体 GV from 6 weeks-old-cytoplasm from 6 months-old	8	197	182(92.4) ^a	152(83.5) ^a
6 周龄胞质体-6 月龄 GV Cytoplasm from 6 weeks-old-GV from 6 months-old	8	203	194(95.6) ^a	166(85.6) ^a
6 周龄 GV-9 月龄胞质体 GV GV from 6 weeks-old-cytoplasm from 9 months-old	8	166	153(92.2) ^a	135(88.2) ^a
6 周龄胞质体-9 月龄 GV Cytoplasm from 6 weeks-old-GV from 9 months-old	8	175	157(89.7) ^a	134(85.4) ^a
6 周龄 GV-12 月龄胞质体 GV from 6 weeks-old-cytoplasm from 12 months-old	8	159	150(94.3) ^a	127(84.7) ^a
6 周龄胞质体-12 月龄 GV Cytoplasm from 6 weeks-old-GV from 12 months-old	8	173	161(93.1) ^a	139(86.3) ^a
6 周龄对照 Control from 6 weeks-old	8	189	-	167(88.4) ^a
6 月龄对照 Control from 6 months-old	8	200	-	173(86.5) ^a
9 月龄对照 Control from 9 months-old	8	158	-	140(88.6) ^a
12 月龄对照 Control from 12 months-old	8	102	-	91(89.2) ^a

a, b 同一字母的数值之间比较无显著差异, $P > 0.05$ (χ^2 检验)。

a, b Values with the same letters are not significantly different from each other, $P > 0.05$ (χ^2 -test).

3 讨论

近几年来,已对人和多种哺乳动物同年龄段的卵母细胞进行了 GV 移植研究, GV 移植时 GV 及受体胞质体的完整性未被显微操作和融合处理所损害,这是因为重组卵母细胞的成熟率与对照卵母细胞的相同,并有正常的核型和减数分裂纺锤体,证明 GV 移植后的重组 GV 期卵母细胞能正常成熟^[3-5]。我们将 6 ~ 8 周龄小鼠卵母细胞分别与 6 月龄、9 月龄和 12 月龄小鼠卵母细胞进行了 GV 互换,所构成的 6 种 GV-胞质体复合体的融合率均在 89% 以上,6 种 GV-胞质体复合体的融合率相互比较无显著差异,重组卵母细胞的成熟率在 83.5% ~ 88.2% 之间,6 种重组卵母细胞的成熟率之间相互比

较以及与相应对照卵母细胞的成熟率比较均无显著差异。本研究表明,由不同年龄小鼠卵母细胞构成的 6 种 GV-胞质体复合体的融合率和 6 种重组卵母细胞的成熟率并不因小鼠年龄的改变而有所变化。

本研究中,不同年龄段小鼠 GV 期卵母细胞经 GV 互换后,将成熟的 6 种重组卵母细胞再进行体外受精,发育到原核和 2-细胞期胚的比率分别为 80.0% ~ 87.3% 和 42.7% ~ 50.9%,6 种重组卵母细胞发育到原核期和 2-细胞期胚的比率无显著差异,与相应对照卵母细胞比较亦无显著差异。小鼠卵母细胞的体外受精有多种方法,其中之一是以酸性台式液对透明带钻孔和用显微切口针对透明带直接切口^[8,9],透明带钻孔和透明带切口的小鼠卵母细胞的受精率显著

高于透明带完整的对照卵母细胞,透明带切口的多精受精率未增加,透明带钻孔的多精受精率虽有增加,但统计学上并不显著;透明带钻孔、切口和完整的受精卵发育到囊胚及囊胚移植后胚胎着床的比率无差异^[9]。本研究利用了GV移植时在透明带上留下的切口(对照卵母细

胞透明带也做切口)同样获得了满意的受精率。研究结果表明,在不同年龄段小鼠进行GV互换所形成的6种重组卵母细胞,在经过体外受精后,形成原核期和2-细胞期胚的比率并不因年龄的增长所带来的细胞质或细胞核的改变而受到影响。

表2 成熟的重组卵母细胞经体外受精的发育
Table 2 Development of the reconstructed oocytes after IVF

GV-胞质体复合体类型 Types of GV-cytoplasm complexes	重复次数 No. of replicates	实验卵数 No. of oocytes analyzed	原核期胚 Pronuclear stage (%)	2-细胞期胚 2-cell embryo (%)
6周龄GV-6月龄胞质体 GV from 6 weeks-old-cytoplasm from 6 months-old	4	74	61(82.4) ^a	31(43.2) ^b
6周龄胞质体-6月龄GV Cytoplasm from 6 weeks-old-GV from 6 months-old	4	75	60(80.0) ^a	31(42.7) ^b
6周龄GV-9月龄胞质体 GV from 6 weeks-old-cytoplasm from 9 months-old	4	70	59(84.3) ^a	30(42.9) ^b
6周龄胞质体-9月龄GV Cytoplasm from 6 weeks-old-GV from 9 months-old	4	63	55(87.3) ^a	27(42.9) ^b
6周龄GV-12月龄胞质体 GV from 6 weeks-old-cytoplasm from 12 months-old	4	51	41(82.4) ^a	23(45.1) ^b
6周龄胞质体-12月龄GV Cytoplasm from 6 weeks-old-GV from 12 months-old	4	55	44(80.0) ^a	28(50.9) ^b
6周龄对照 Control from 6 weeks-old	4	83	74(89.2) ^a	41(50.6) ^b
6月龄对照 Control from 6 months-old	4	84	71(84.5) ^a	39(46.4) ^b
9月龄对照 Control from 9 months-old	4	69	58(84.1) ^a	31(44.9) ^b
12月龄对照 Control from 12 months-old	4	46	38(82.6) ^a	21(47.8) ^b

a, b 同一字母的数值之间比较无显著差异, $P > 0.05$ (χ^2 检验)。

a, b Values with the same letters are not significantly different from each other, $P > 0.05$ (χ^2 -test).

然而,我们也注意到,不管是6种重组的卵母细胞还是4种对照的卵母细胞,发育到2-细胞期胚的比率都很低,且基本停滞于2-细胞期,极少发育到3-细胞或4-细胞期胚。发育停滞可能是由于收集的GV期卵母细胞被剥夺了卵泡内促性腺激素直接和间接的作用,以及缺乏卵丘细胞与卵母细胞的连接和相互作用,而它们对卵母细胞发育和功能的多个方面都是重要的^[10]。GV移植可以作为一项措施以拯救来自第一次减数分裂期间与女性衰老相关的非整倍性增加的基因组^[5]。然而,如果这种拯救是

可行的话,重组卵母细胞必须能受精,随后进行胚胎发育。已有学者将通过GV移植获得的小鼠重组卵母细胞体外成熟后,在MII期或原核期再进行核移植或互换,可以发育到囊胚或发育到晚期^[11,12]。在兔,由GV期卵母细胞的单次核移植已获得正常的后代^[6]。

通过GV移植建立的重组卵母细胞可以作为一个适宜的细胞模型——用于确定老龄个体卵母细胞非整倍性增加的细胞内因子和/或机制。由于可以在不同质量和年龄的卵母细胞之间进行GV互换,所以GV移植可用于确定卵细

胞质在染色体未分离中的作用,以及细胞质的作用能否解决卵母细胞成熟时呈现的遗传或发育异常,即高龄妇女卵母细胞非整倍性的发生增加。下一步工作就是检测各种重组卵母细胞成熟过程中的纺锤体结构、染色体排列、染色体数目等变化,以探讨老龄个体减数分裂异常的细胞质或细胞核机制。

参 考 文 献

- [1] Dailey T , Dale B , Cohen J , *et al.* Association between nondisjunction and maternal age in meiosis-II human oocytes. *Am J Hum Genet* ,1996 **59** :176 ~ 184.
- [2] Moore D P ,Orr-Weaver T L. Chromosome segregation during meiosis :building an unambivalent bivalent. *Curr Top Dev Biol* ,1998 **37** 263 ~ 299.
- [3] Takeuchi T ,Ergtin B ,Huang T H ,*et al.* A reliable technique of nuclear transplantation for immature mammalian oocytes. *Hum Reprod* ,1999 **14** :1 312 ~ 1 317.
- [4] Liu H ,Wang C W ,Grifo J A ,*et al.* Reconstruction of mouse oocytes by germinal vesicle transfer :maturity of host oocyte cytoplasm determines meiosis. *Hum Reprod* ,1999 **14** 2 357 ~ 2 361.
- [5] Zhang J ,Wang C W ,Krey L ,*et al.* *In vitro* maturation of human preovulatory oocytes reconstructed by germinal vesicle transfer. *Fertil Steril* ,1999 **71** 726 ~ 731.
- [6] Li G P ,Chen D Y ,Lian L ,*et al.* Viable rabbits derived from reconstructed oocytes by germinal vesicle transfer after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Mol Reprod Dev* , 2001 **58** :180 ~ 185.
- [7] Hogan B ,Costantini F ,Lacy E. *Manipulating the Mouse Embryo a Laboratory Manual*. New York :Cold Spring Harbor Laboratory ,1986 ,107 ~ 109.
- [8] Gordon J W ,Talanski B E. Assisted fertilization by zona drilling :a mouse model for correction of oligospermia. *J Exp Zool* ,1986 **239** 347 ~ 354.
- [9] Depypere H T ,McLaughlin K J ,Seamark R F ,*et al.* Comparison of zona cutting and zona drilling as techniques for assisted fertilization in the mouse. *J Reprod Fert* ,1988 **84** 205 ~ 211.
- [10] Eppig J J ,Peters A H ,Telfer E E ,*et al.* Production of cumulus expansion enabling factor by mouse oocytes grown *in vitro* :preliminary characterization of the factor. *Mor Reprod Dev* ,1993 **34** 450 ~ 456.
- [11] Liu H ,Zhang J ,Krey L C ,*et al.* *In-vitro* development of mouse zygotes following reconstruction by sequential transfer of germinal vesicles and haploid pronuclei. *Hum Reprod* ,2000 , **15** :1 997 ~ 2 002.
- [12] Bao S ,Obata Y ,Carroll J ,*et al.* Epigenetic modifications necessary for normal Development are established during oocyte growth in mice. *Biol Reprod* 2000 **62** 616 ~ 621.