

哺乳动物卵母细胞孤雌发育研究*

刘红林**

(南京师范大学生物系 南京 210097)

范必勤

(江苏农科院牧医所 南京 210014)

关键词 哺乳动物 卵母细胞 孤雌发育

孤雌发育(Parthenogenesis)被解释为没有雄性配子参与由雌性配子进行的发育^[1]。孤雌生殖现象在无脊椎动物较为普遍,在爬行类动物、鱼类动物、鸟类动物也存在着一定程度的孤雌生殖现象。两栖类动物的卵子能够为实验激活、卵裂,并且有少数可以发育成个体。然而至今为止,哺乳类动物卵子人工激活后,仅能产生有限的发育,孤雌胚在附植后数天内死亡^[2]。关于哺乳动物卵子的激活与发育,范必勤等已有综述,本文将着重近期研究进展,对孤雌发育及其孤雌胚死亡原因进行论述。

1 卵子的激活

1.1 卵子的自发激活 在人类和其它哺乳类动物都有排出卵子自发孤雌发育的报道。在人类从诱导或自发流产的多例孕体中发现有单倍体存在^[3]。在其它许多种哺乳动物也曾观察到排出卵子在输卵管内自发激活和卵裂。卵巢卵泡内卵子的孤雌发育可造成一定比例的卵巢肿瘤(如畸胎瘤)。人类和其它哺乳动物都存在自发的畸胎瘤。电泳分析证明:畸胎瘤是由完成了第一次减数分裂的卵母细胞孤雌激活后发育而成,而不是由卵原细胞或原始卵母细胞有

丝分裂形成。

1.2 卵子的人工激活 卵子人工激活的方法及其激活类型范必勤等已有较为详细的论述。对卵龄和细胞骨架构成相互关系的研究揭示出各种孤雌激活类型产生的机制。Webb 等研究发现^[4]:在体内随着卵龄的增加细胞骨架的构成亦发生变化。在 hCG(人绒毛膜促性腺激素)注射后 12-20h,大多数卵子的减数分裂器位于卵子的周边,上方有一富含肌动蛋白的区域,这些卵子激活后倾向于形成均质单倍体;在 hCG 后 24-28h,许多卵子具有中央纺锤体和均匀分布的皮质肌动蛋白,在此期间嵌合单倍体为主要的激活类型;在 hCG 注射后 12-32h 间产生一定比例的两原核的孤雌激活类型,这些卵子通常含有一个周边纺锤体和均匀分布的皮质肌动蛋白;至于在此期间产生的只有一个原核的孤雌类型则通常是由于纺锤体的破裂。

1.3 激活的可能机制 目前卵子激活的确切

* 本研究受国家自然科学基金资助(批准号:39370516);

** 本文研究工作在江苏农科院,牧医所完成;

第一作者介绍:刘红林,男,31岁,副教授,博士;现在南京农业大学动物科技学院工作 南京 210095;

收稿日期:1995-12-22,修回日期:1996-11-12。

机制尚不清楚。据研究促成熟因子(Maturation Promoting Factor, MPF)可实现细胞从间期到分裂期的转变^[5]。在间期末 MPF 活性暂时升高。导致细胞分裂,而当 MPF 活性下降时细胞进入下一个分裂间期。成熟卵子由于受到一种对 Ca^{2+} 敏感的细胞生长抑制因子(Cyto-Static Factor, CSF)的抑制作用而停留在第二次减数分裂的中期(M II), CSF 的这种作用是通过稳定 MPF 的活性而实现的。受精和人工激活引发了细胞内 Ca^{2+} 水平的脉冲性升高,解除了 CSF 的抑制作用,导致 MPF 活性下降,卵子完成第二次减数分裂而进入有丝分裂间期。

一般认为细胞内游离 Ca^{2+} 浓度的变化在卵子受精激活和人工激活过程中有着重要作用。哺乳动物卵母细胞在受精过程中因精子的激活作用,使细胞内游离 Ca^{2+} 呈多次有规律的脉冲升高^[6];人工激活试验同样发现胞质 Ca^{2+} 的脉冲性升高^[7]。邓满齐等研究发现^[8]:抑制卵内游离 Ca^{2+} 的升高则抑制了卵激活的一系列反应。 Ca^{2+} 浓度升高是卵激活重要的诱导信号。但是,对于大龄卵(hCG 后 18h 以上),诱导胞质 Ca^{2+} 升高 1 次即可有效激活卵子,而对刚排出不久的卵(hCG 后 12-13h)则无效,只有诱导卵内 Ca^{2+} 多次升高才能使之激活。研究还认为: Ca^{2+} 浓度的升高可以来自 Ca^{2+} 库释放,也可由外 Ca^{2+} 内流引起。由于 Ca^{2+} 库释放不能完全为 IP_3 (免疫过氧化酶)受体抑制剂-肝素钠所抑制,这表明 IP_3 敏感钙库不是 Ca^{2+} 波动的主要的 Ca^{2+} 源。

胞质 Ca^{2+} 浓度的脉冲升高可引起卵母细胞的激活,但并非诱导卵激活一定需要 Ca^{2+} 浓度的脉冲升高。Moses 等在用蛋白合成抑制剂亚胺环己酮诱导小鼠卵母细胞激活过程中未观察到 Ca^{2+} 浓度的变化。他们认为,蛋白合成抑制剂的这种激活作用是通过抑制 Cyclin B 的合成来影响有活性 MPF 生成而实现的^[9]。

2 孤雌胚的发育及其死亡原因分析

2.1 附植前的发育 孤雌胚能够完成附植前

的发育产生形态正常的囊胚;体外条件下,极少数二倍体孤雌胚可发育至前羊膜腔期甚至到达圆筒期。附植前孤雌胚的形态结构与相应阶段的正常受精胚胎相似,唯一的区别在于孤雌胚细胞质中所含晶体样的包涵体较少,包涵体与胚胎发育能力的相关尚未确定。与正常受精胚相比,孤雌胚的体内发育能力均较差,孤雌激活卵的卵裂率和囊胚形成率均低于正常受精卵。此外,所有类型孤雌胚的发育速度都比正常受精胚慢,均质单倍体的卵裂速率尤其慢。不同类型孤雌胚发育能力亦相同,二倍体孤雌胚的生活力超过均质单倍体和嵌合单倍体。

小鼠正常受精胚和二倍体孤雌胚在 8-细胞期开始致密化,而嵌合型单倍体到 16-细胞期才开始致密化过程。Kaufman 发现,有些单倍体在发育至 8-细胞时恢复二倍体,因而它们发育至桑椹胚阶段被延迟^[10]。卵裂不同步是单倍体的一个典型特征,这导致了组成桑椹胚,囊胚的细胞呈现明显的异质性,有些卵裂球的卵裂速度与其它卵裂球相比被耽搁 1-2 次。在囊胚滋养层中发现形状不同,大小不一的细胞类型;而这在正常囊胚中是不存在的。单倍体囊胚虽然看起来形态正常,但存在一些严重的不足。

2.2 附植后的发育 由于孤雌胚附植后的存活率很低,因而附植后发育的研究还很不够。大约 25% - 30% 体内电激活的孤雌胚在 6-7 日龄时可以诱导脱膜反应并发育至圆筒期,但在第 8 日龄时胚胎死亡急剧增加,到 9-10 日龄只有极少数的胚胎存活下来。Witkowska 用体内电激活法在 10 日龄时得到了一枚形态正常的 8 体节孤雌胚^[11]。Kaufman 在排卵后不同时期用麻醉剂 Avertin 麻醉小鼠,促使卵子激活;结果发现有一定比例的孤雌激活卵发育至附植后阶段,但只发育至圆筒期^[12]。再有将体外孤雌激活的单倍体和二倍体孤雌胚移植入假孕 1d 的受体,6-7d 后在妊娠受体中分别观察到 35.1% 和 50% 的孤雌胚发生的附植^[13]。如果通过卵巢切除人为延迟附植就会有更多的孤雌胚发育至早圆筒期,在附植前发育至适当

细胞数的孤雌胚用卵巢切除的受体延迟发育, 胚胎可存活至 10 - 11 日龄, 其中部分胚胎可到达 25 - 30 体节, 并拥有形态正常的前肢芽^[14]。这些稀少的附植后发育孤雌胎儿未见形态异常, 但表现出胚外组织发育不良。在小鼠尚未发现发育至 11 日龄后的孤雌胚。

曾有采用渗透压和低温激活免卵成功获得孤雌兔成体的报道, 但迄今未能得到试验重复。Ozil 报道^[15], 虽然免电激活卵子有很高的附植率, 甚至部分可发育至 10.5d, 但在 11 日龄时死亡。这与小鼠孤雌胚胎的死亡时期相近。

2.3 孤雌胚死亡原因分析 所有试图生产小鼠孤雌个体的尝试均未成功。在大量的孤雌发育研究中, 只有少数孤雌胚可以在附植后发育。孤雌胚的死亡不只局限在某一特定阶段, 相反它分布于从第一次卵裂开始到附植早期阶段的各个时期。有些卵激活后不能卵裂或发育不超过 2- 细胞阶段; 有些孤雌胚则在卵裂, 致密化或囊胚形成过程中死亡; 大部分在附植时死亡, 这可能是由于胚龄和子宫环境的不同步。孤雌胚移入受体体内发育, 由于孤雌胚发育速度慢于正常受精胚, 因而经过一段时间发育后, 胚胎的发育相对落后于子宫环境的变化, 造成二者的不同步, 从而影响胚胎的附植和发育, 为了克服子宫环境与胚胎发育不同步性, Kaufman 等将在中间受体体内发育至囊胚的孤雌胚(与 3.5 日龄的受精囊胚时期相当)从受体子宫冲出, 再移入假孕第 2.5d 的终端受体, 结果胚胎的附植率显著提高。但胚胎发育至圆筒期的比率无显著增加^[13]。

发育至圆筒期, 甚至发育至肢芽阶段孤雌胚的死亡原因仍不很清楚。发育至附植后阶段孤雌胚的总体形态和超微结构未见异常, 但据报道, 附植后的小鼠孤雌胚胎表现出胚胎外膜分化的延迟^[10]。胚胎嵌合和重组试验证明, 小鼠雌核胚成分形成原始外胚层, 即胚体和卵黄囊中胚层; 雄核胚成分形成滋养层和原始内胚层^[16]。孤雌胚的死亡可能是由于不能形成卵黄囊内胚层。但这个结论似乎并不适合免孤雌发育的情形。Ozil 报道^[15], 发育至体节期的免

孤雌胚未见胚胎外膜发育延迟, 孤雌胚的死亡与胚胎外膜的发育没有直接相关。

孤雌胚异位移植产生畸胎瘤, 而且在这些畸胎瘤内由孤雌发生起源的二倍体细胞可以分化形成各种细胞类型。另外孤雌胚可以与正常受精胚胎嵌合生成嵌合体, 而且在成年嵌合体的不同组织和器官中都检测到孤雌发育细胞, 甚至某些孤雌细胞可生成具有功能活性的生殖细胞^[16]。所有这些试验结果表明, 孤雌胚的死亡不是由于细胞死亡或细胞分化潜能的缺陷。

有两个假说用来说明孤雌胚附植后发育失败的原因: 其一是激活卵细胞质功能缺陷; 其二是激活卵细胞核功能缺陷。支持细胞质功能缺陷的证据主要有二条。Hoppe 等报道^[17]: 杂合的雌核胚和杂合的雄核胚可完成附植后的发育过程, 并且试验得到了由雌核胚和雄核胚发育而成的小鼠个体。然而后来大量的研究证明: 虽然雌核胚和雄核胚可完成附植前发育, 甚至可附植发育至早体节期, 但在随后的发育中死亡, Hoppe 的结果可能是由于去核不完全造成的。第二条证据也是由 Hoppe 报道的^[18]。Hoppe 将孤雌囊胚内细胞团的细胞核移入去核受精卵得到正常后代, 然而所有试图重复这个结果的试验均告失败; 相反试验反复证明: 雄原核移入单倍体孤雌胚可得到正常后代, 而含有两个雌原核的胚胎只能发生有限的发育。将雌、雄原核一起移入去核孤雌激活卵得到正常后代; 而将孤雌胚的两个原核移入去核受精卵则不能发育至附植后阶段。除此之外, 研究还发现虽然在受精过程中, 精子细胞质成分也能进入卵子, 并与卵子细胞质相结合, 但受精后不久, 精子这些成分如线粒体等发生退化, 在随后发育过程中不起作用。因而目前倾向认为孤雌胚死亡是由于雌核存在某种程度的功能缺陷。

孤雌胚在遗传上是等位基因的纯合子, 由此人们推测, 孤雌胚的死亡是由于隐性致死基因的表达。然而这种解释未能为实验所证实, 相反实验证明: 在单倍体孤雌胚或移除雄原核的合子中移入一个雌原核构成雌核胚, 其具有双亲本性和杂合子性, 但雌核胚与孤雌胚一样

在着床后数天内死亡;而对照组由雌雄原核构成的重建胚能够完成个体发育过程。近年来,对内源性基因和外源导入基因表达特性的研究^[19],人们相信:来源于父母本的基因在配子发生过程中发生修饰作用,即“imprinting”,从而使二者在胚胎发育过程中具有不同功能。Surani 提出^[16];在配子发生过程中,染色体一些区域发生修饰,染色体的这种修饰作用能够传播,而且当胚胎发育到一定阶段时,染色体的修饰在特定组织中可为胚胎所识别。最初的修饰作用发生在配子减数分裂同源染色体分离过程中,DNA 的甲基化状态可能是修饰作用的一个重要方面。有证据表明:精子和卵子中某些 DNA 片段的甲基化程度不同,在卵子中甲基化不足的 DNA 片段,在精子中则高度甲基化。由于染色体的修饰作用,从而使一些内源性基因随着父母本来源不同而出现不同的表达。对染色体修饰的识别可能是由片段特异性 DNA 结合蛋白完成的,而且这些蛋白质随着发育阶段和胚胎组织的不同而异。雌雄原核间存在染色体不同修饰作用的发现说明了,雌雄原核间存在互补作用,它们的共同存在和不同表达对胚胎正常发育是必不可少的。

参 考 文 献

- 1 Kautinan, M. H. In: Methods in mammalian reproduction (ed. J. C. Daniel Jr.) Academic Press, New York, 1978. 21 - 49.
- 2 范必勤, 邓满齐. 哺乳动物卵的激活与孤雌发育. 生物工程进展, 1994, 14(3): 50 - 54.
- 3 Lauritsen, J. G. The cytogenetics of spontaneous abortion. *Res. Reprod.*, 1982, 14(3): 3 - 4.
- 4 Webb, M., S. Howlett and B. Maro. Parthenogenesis and cytoskeletal organization in ageing mouse eggs. *J. Embryol. exp. Morph.*, 1986, 95: 131 - 145.
- 5 Nurse, P. Universal control mechanism regulating onset of M phase. *Nature*, 1990, 344(5): 503 - 507.
- 6 Miyazaki, S. I. Repetitive calcium transients in hamster eggs.

Cell Calcium, 1991, 12: 205 - 216.

- 7 Vitullo, A. and J. P. Ozil. Repetitive Calcium stimuli drive meiotic resumption and pronuclear development during mouse oocyte activation. *Dev. Biol.*, 1992, 151: 128 - 136.
- 8 邓满齐, 范必勤. 小鼠卵激活过程中胞质游离 Ca^{2+} 的变化及孤雌发育研究. 实验生物学报, 1994, 27(3): 289 - 297.
- 9 Moses, R. M. and D. Klone. Release of mouse eggs from metaphase arrest by protein synthesis inhibition in the absence of a calcium signal or microtubule assembly. *Mol. Reprod Dev.*, 1995, 41: 264 - 273.
- 10 Kaufman, M. H. In: Progress in anatomy (ed. R. J. Harrison and R. L. Holmes) Cambridge University Press, London, 1981. 1 - 34.
- 11 Witkowska, A. Parthenogenetic development of mouse embryos in vivo. *J. Embryol. exp. morphol.*, 1973, 30: 547 - 560.
- 12 Kaufman, M. H. Parthenogenetic activation of mouse oocytes following avertin anaesthesia. *J. Embryol. exp. morphol.*, 1975, 33: 941 - 946.
- 13 Kaufman, M. H. and R. L. Gardner. Diploid and haploid mouse parthenogenetic development following in vitro activation and embryo transfer. *J. Embryol. exp. morphol.*, 1974, 31: 635 - 642.
- 14 Kaufman, M. H., S. C. Barton and M. A. H. Surani. Normal postimplantation development of mouse parthenogenetic embryos to the forelimb bud stage. *Nature*, 1977, 265: 53 - 55.
- 15 Ozil, J. P. The parthenogenetic development of rabbit oocytes after repetitive pulsatile electrical stimulation. *Development*, 1990, 109: 117 - 127.
- 16 Surani, M. A. H., S. C. Barton and M. L. Norris. Experimental reconstruction of mouse eggs and embryos; An analysis of mammalian development. *Biol. Reprod.*, 1987, 36: 1 - 16.
- 17 Hoppe, P. C. and K. Illmensee. Microsurgically produced homozygous diploid uniparental mice. *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, 1977, 74: 5657 - 5661.
- 18 Hoppe, P. C. and K. Illmensee. Full term development after transplantation of parthenogenetic embryonic nuclei fertilized mouse eggs. *Proc. nat. Acad. Sci. UAS*, 1982, 79: 1912 - 1916.
- 19 Solter, D. Differential imprinting and expression of maternal and paternal genomes. *Annu. Rev. Genet.*, 1988, 22: 127 - 146.