

# 3 种药物对老化卵母细胞 4 种母源 mRNA 水平的影响

叶小芳<sup>①②③</sup> 陈静波<sup>①</sup> 侯敏<sup>①</sup> 汪立芹<sup>①</sup> 赵云程<sup>①</sup> 林嘉鹏<sup>①</sup> 黄俊成<sup>①\*</sup>

(<sup>①</sup> 新疆畜牧科学院 农业部草食家畜繁育生物技术重点开放实验室 乌鲁木齐 830000;

<sup>②</sup> 石河子大学动物科技学院 石河子 832000; <sup>③</sup> 新疆师范大学生命科学院 乌鲁木齐 830000)

**摘要:**利用 Real-Time PCR 技术定量分析了绵羊 (*Ovis aries*) 卵母细胞在生长-成熟-老化过程 4 种母源 mRNA (*Mater*、*Zar1*、*Dnmt1*、*GDF9*) 发生的动态变化,以及 3 种药物(咖啡因、DTT 和硫酸盐)对老化卵母细胞母源 mRNA 水平的影响。结果显示,除 *Dnmt1* 在 12 h 开始下降外,卵母细胞中其他 3 个基因的表达量都是从生发泡期逐渐下降,且在体外培养至 24 h 降到最低,然后随着卵母细胞的老化又逐渐上升。其中 *GDF9* 和 *Mater* 2 个基因在 30 h 组的卵母细胞中的表达量显著高于 24 h 组卵母细胞 ( $P < 0.05$ )。30 h 卵母细胞中 *Zar1* 和 *Dnmt1* 的转录水平与 24 h 卵母细胞差异不显著 ( $P > 0.05$ )。除 *Zar1* 外,咖啡因和 DTT 都显著降低了老化卵母细胞中其他 3 个基因的表达量 ( $P < 0.05$ ),且所有基因表达量与 24 h 组卵母细胞差异不显著 ( $P > 0.05$ )。硫酸盐处理后的卵母细胞其 4 种母源 mRNA 水平都是最高,除 *Zar1* 外其他 3 个基因表达量都显著高于 24 h 组 ( $P < 0.05$ )。结论是, *Mater*、*Zar1*、*Dnmt1*、*GDF9* 4 种母源 mRNA 水平与卵母细胞质量成反比,咖啡因和 DTT 能在一定程度上延缓卵母细胞的衰老,改善卵母细胞质量;而硫酸盐则加速了卵母细胞老化进程,降低了卵母细胞质量。

**关键词:**咖啡因;DTT;硫酸盐;老化卵母细胞;母源 mRNA

中图分类号:S826 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2010)05-154-10

## The Effects of Three Drugs on Maternal mRNA Level in Aged Oocytes

YE Xiao-Fang<sup>①②③</sup> CHEN Jing-Bo<sup>①</sup> HOU Min<sup>①</sup> WANG Li-Qin<sup>①</sup>

ZHAO Yun-Cheng<sup>①</sup> LIN Jia-Peng<sup>①</sup> HUANG Jun-Cheng<sup>①\*</sup>

(<sup>①</sup>Key Laboratory of Reproduction & Breeding Biotechnology of Grass Feeding Livestock, Ministry of Agriculture, Xinjiang Academy of Animal Sciences, Urumqi 830000; <sup>②</sup>College of Animal Science and Technology, Shihezi University,

Shihezi 832000; <sup>③</sup>College of Life Science, Xinjiang Normal University, Urumqi 830000, China)

**Abstract:**This study used Real-Time PCR technique to quantitatively analyze the expression of the maternal mRNA (*Mater*, *Zar1*, *Dnmt1* and *GDF9*) in growth-maturation-aging process of ovine oocytes and investigated the effect of caffeine, DTT and vanadate on the level of maternal mRNA in aged oocytes, respectively. The results showed that the expression of *GDF9*, *Mater* and *Zar1* decreased gradually from germinal vesicle phase to

基金项目 新疆维吾尔自治区科技攻关重点项目 (No. 200841122), 中国博士后科学基金资助项目, 国家高技术研究发展计划项目 (No. 2008AA101007);

\* 通讯作者, E-mail: h\_jc@163.com;

第一作者介绍 叶小芳, 女, 博士研究生; 研究方向: 动物胚胎工程和生物技术; E-mail: YXF001982@sina.com。

单位①与单位②为共同第一署名单位。

收稿日期:2010-03-15, 修回日期:2010-07-15

M II phase, while the expression of *Dnmt1* decreased gradually from 12 h of maturation culture. The level of all above maternal mRNAs was the lowest at M II phase and increased with aging. The expression of *Mater*, *Dnmt1* and *GDF9* in caffeine treated-or DTT-treated aged oocytes was lower than that of aged oocytes ( $P < 0.05$ ), but not different from that of matured oocytes ( $P > 0.05$ ). The expression of *Mater*, *Zar1*, *Dnmt1*, and *GDF9* in vanadate-treated oocytes was the highest and significantly higher than that of MII group except for *Zar1* ( $P < 0.05$ ). Conclusion: the level of *Mater*, *Zar1*, *Dnmt1*, and *GDF9* is in contrast with oocytes quality. Both caffeine and DTT delay aging progression to some extent and improve the oocyte quality. On the contrary, vanadate accelerates aging progression.

**Key words:** Caffeine; DTT; Vanadate; Aged oocyte; Maternal mRNA

卵母细胞在成熟过程中产生并积累了一些对卵母细胞向胚胎转变以及胚胎的早期发育起着关键作用的母源性 mRNA 和蛋白质<sup>[1]</sup>。研究表明母源因子的敲除会影响胚胎卵裂<sup>[2-3]</sup>。目前已发现大约 100 多种与小鼠 (*Mus musculus*) 早期胚胎发育相关的卵母细胞基因,但是研究透彻的还比较少<sup>[4]</sup>,尤其关于绵羊 (*Ovis aries*) 母源基因的研究则更少。其中胚胎必要的母体抗原 (maternal antigen that embryos require, *Mater*)、合子阻滞因子 1 (zygote arrest 1, *Zar1*)、DNA 甲基化酶 1 [DNA (cytosine-5) methyltransferase 1, *Dnmt1*] 和生长分化因子 9 (growth differentiation factor 9, *GDF9*) 4 个母源基因是目前发育生物学领域研究的热点。

*Mater* 是一种卵胞质特异表达基因。*Mater* 基因敲除后,小鼠胚胎发育阻断在 2 细胞期。*Mater* 缺失导致雌鼠不孕,然而不影响其卵子发生、卵巢发育、卵母细胞成熟、排卵或受精<sup>[2]</sup>。*Zar1* 在卵母细胞及小鼠 1 细胞期胚胎中大量表达,主要定位于胞浆。*Zar1* 缺失的小鼠胚胎大多停留在 1 细胞期,且不能受孕<sup>[3]</sup>。*Zar1* 在小鼠的卵子发生晚期,其卵母细胞转录失活,在卵母细胞减数分裂/成熟期和排卵期多数母性 RNA 被降解<sup>[5]</sup>。*GDF9* 的异常同样也可引起生育力的下降<sup>[6]</sup>。*GDF9* 在卵泡发育过程中必不可少,它能维持卵泡的正常形态,调控卵泡细胞的增殖和分化<sup>[7]</sup>。体外发育卵母细胞 *GDF9* 的表达异常对卵母细胞成熟有重要影响。*GDF9* 缺乏的雌鼠由于卵泡发育停滞,不再继续生长,最终导致不孕<sup>[8]</sup>。*Dnmt1* 是胚胎发生中保持基因甲基化的关键酶。*Dnmt1* 失活对小鼠胚胎的

发育有致命性影响,而对胚胎干细胞的存活无明显影响<sup>[5]</sup>。小鼠的 *Dnmt1* 基因敲除可导致印记基因的双等位基因表达<sup>[9]</sup>。

停滞在 M II 期的哺乳动物卵母细胞如果不能及时受精,随着体外继续培养或在输卵管中停留时间的延长,卵母细胞会逐渐发生老化,继而引起包括人在内的哺乳动物的胚胎发育异常甚至死亡。业已证明在培养基中添加某些药物可以延缓卵母细胞老化的进程<sup>[10-12]</sup>。Kikuchi<sup>[13]</sup>通过钒酸盐和咖啡因调节成熟促进因子 (maturation promoting factor, MPF) 活性来观察排卵后卵母细胞老化进程的变化情况。结果发现,咖啡因可以延迟卵母细胞的老化过程,其机制可能是通过抑制 Myt1/Wee1 通路而抑制老化卵母细胞中的 cdc2 (cell division cycle 2) 磷酸化从而升高 MPF 的活性。相反,钒酸盐主要通过抑制 cdc25 的活性而抑制卵母细胞中的 cdc2 去磷酸化从而降低 MPF 的活性。二巯苏糖醇 (dithiothreitol, DTT) 的巯基与氧自由基结合,中断自由基链反应,并能阻止和抑制卵母细胞中老化相关的组蛋白 H1 激酶活性下降。其作用机制主要是通过保护酪氨酸磷酸酶 p80cdc25 处于一种还原状态。反过来,DTT 对 p80cdc25 的还原作用将会保护 p34cdc2 发生去磷酸化,从而维持 MPF 活性形式。培养液中添加 DTT 能抵抗成熟或老化卵母细胞中的巯基氧化现象<sup>[12]</sup>,可以减轻老化引起的细胞碎片增多以及如谷胱甘肽转移酶活性和囊胚率降低等副作用。前期实验也证明绵羊卵母细胞在体外培养到 30 h 时就已经发生老化,咖啡因和 DTT 一定程度的延缓了卵母细胞老化并提高了卵母

细胞的后续发育能力,而硫酸盐则加速了卵母细胞的老化,是一种促老化药物(未发表)。但至今尚未见到这些药物延缓卵母细胞老化分子生物学方面的报道。因此,目前的研究是在前期实验的基础上通过观察卵母细胞老化前后,以及经过咖啡因、DTT 和硫酸盐 3 种药物分别处理过的老化卵母细胞,其母源 mRNA (*Mater*、*Zar1*、*Dnmt1*、*GDF9*) 表达量变化情况来了解延缓老化的药物是怎样从分子水平调节卵母细胞的老化进程的。以前对老化的研究主要集中在形态学和细胞水平上,如果证明这些药物能调节老化卵母细胞母源基因表达量,那么以后就可以将母源基因表达量的变化作为判断卵母细胞是否老化以及选择合适的能有效延缓卵母细胞老化的药物的分子生物学指标,而且这也为卵母细胞体外成熟培养体系的优化、辅助生殖技术效率的提高提供了理论基础。

## 1 材料与方 法

**1.1 试剂** 卵母细胞体外培养试剂除 TCM-199、胎牛血清购自 Gibco 公司,其他均购自 Sigma 公司。咖啡因 (Sigma, C-0750)、DTT (Sigma, D0632)、硫酸盐 (Wako Pure Chemical, 198-09752)、Qiagen Reasy Micro 试剂盒、RT-PCR 试剂盒 (宝生物)、胶回收试剂盒 (QIAEX II Gel Extraction Kit)、质粒提取试剂盒 (Promega 公司的 Wizard Plus SV Minipres DNA Purification System)、DH5 $\alpha$ -大肠杆菌 (北京天根)、Pmd-20. T 载体 (TaKaRa)、T4 DNA 连接酶 (TaKaRa)。

**1.2 卵母细胞收集和成熟** 将从屠宰场采集的绵羊卵巢保存于 37 $^{\circ}$ C 的灭菌生理盐水中 2 h 内运至实验室,用 75% 酒精消毒,生理盐水冲洗卵巢,然后用带有 12 号针头的 10 ml 注射器抽取卵巢表面直径 2~6 mm 卵泡中的卵泡液,于体式显微镜下挑选出包裹 3 层以上卵丘细胞、结构致密的卵母细胞-卵丘细胞复合体,进行体外成熟培养。

卵母细胞体外成熟培养液 (IVM 液): TCM199 + 10% FBS (v : v) + 0.05 U/ml FSH +

1  $\mu$ g 雌激素 + 10 ng/ml EGF + 24.2 mg/ml 丙酮酸钠 + 0.1 mmol/L 半胱胺 + 100 U/ml 青链霉素。

**1.3 细胞模型** 实验室前期研究表明,在绵羊卵母细胞体外培养过程中咖啡因、DTT 和硫酸盐 3 种药物的合适浓度分别为 5 mmol/L、1 mmol/L、100  $\mu$ mol/L。18 h 卵母细胞 (18 h 组):体外成熟培养至 18 h 的卵母细胞;成熟卵母细胞 (24 h 组):体外成熟培养至 24 h 的卵母细胞;老化卵母细胞 (30 h 组):体外成熟培养至 30 h 的卵母细胞。咖啡因处理过的老化卵母细胞 (咖啡因 + 24 h + 6 h 组):将卵母细胞体外成熟培养 24 h,然后在含有 5 mmol/L 咖啡因的成熟培养液里继续培养至 30 h。DTT 处理过的老化卵母细胞 (DTT + 24 h + 6 h 组):将卵母细胞体外成熟培养 24 h,然后在含有 1 mmol/L DTT 的成熟培养液里继续培养至 30 h。硫酸盐处理过的老化卵母细胞 (硫酸盐 + 21 h + 6 h 组):将卵母细胞体外成熟培养 21 h,然后在含有 100  $\mu$ mol/L 硫酸盐的成熟培养液里继续培养至 27 h。

**1.4 RNA 提取和 RT-PCR** 将 1.3 中所提到的 6 组卵母细胞 (80 枚/组) 分别移入 PBS 中冲洗 3 次;然后加入裂解液 80  $\mu$ l 于 0.2 ml PCR 管中混匀,-80 $^{\circ}$ C 保存。采用 Qiagen Reasy Micro 试剂盒提取总 RNA。

反转录体系为 20  $\mu$ l,其中总 RNA 约 0.5  $\mu$ g,Random 6 mer (25  $\mu$ mol/L) 1.0  $\mu$ l,70 $^{\circ}$ C 10 min,迅速置于冰上 2 min,离心数秒使总 RNA、引物等的混合液聚集于 Microtube 管底部,然后加入 dNTPs (各 10 mmol/L) 1.0  $\mu$ l,5  $\times$  PrimeScript Buffer 4.0  $\mu$ l,Rnase Inhibitor (40 U/ $\mu$ l) 0.5  $\mu$ l,Rnase (H $^{-}$ ) 1  $\mu$ l,RNase-free dH $_2$ O 补至 20  $\mu$ l,在 30 $^{\circ}$ C 10 min,42 $^{\circ}$ C 50 min,70 $^{\circ}$ C 10 min 条件下继续反应。反应后的 cDNA 于 -20 $^{\circ}$ C 保存待用。

**1.5 引物合成** 分别根据 GenBank 中牛 18S-rRNA、*Mater*、*Zar1*、*Dnmt1* 和 *GDF9* 序列,用 Oligo 6.0 软件设计上述基因 PCR 扩增的上下游引物 (表 1)。

表 1 扩增 18S-rRNA、*Mater*、*Zar1*、*GDF9* 和 *Dnmt1* 基因片段引物Table 1 Primer pairs used in generating ovine 18S-rRNA, *Mater*, *Zar1*, *GDF9* and *Dnmt1*

基因 Genes	引物序列 Primer sequence		片段大小 (bp) Length
<i>Mater</i>	Forward: 5'-GCTGGAGGCGTGTGGACTG-3'	Reverse: 5'-GGTCTGTAGATTAGAGGTGGGATGC-3'	168
<i>Zar1</i>	Forward: 5'-TGCCGAACATGCCAGAAG-3'	Reverse: 5'-TCACAGGATAGCGCTTTC-3'	168
<i>Dnmt1</i>	Forward: 5'-CCCAGGATTACAAGGAAG-3'	Reverse: 5'-CTGGATGTAACCTCGACGTCTCT-3'	176
<i>GDF9</i>	Forward: 5'-CCCAGGATTACAAGGAAG-3'	Reverse: 5'-CTGGATGTAACCTCGACGTCTCT-3'	198
18S	Forward: 5'-GAGAAACGGCTACCACAT C-3'	Reverse: 5'-GCTATTGGAGCTGGAATT AC-3'	198

**1.6 目的片段连接转化、质粒提取及测序** 以上 5 个基因的 PCR 产物经 2% 琼脂糖电泳,对目的片段进行胶回收处理 (QIAEX II Gel Extraction Kit)。将回收纯化后的目的片段克隆到 pMD20-T 载体中。质粒的转化,进行蓝白斑筛选,菌落 PCR 后大量培养菌液。参考 OMEGA 公司小量质粒制备试剂盒进行 DNA 质粒的提取。重组质粒鉴定结果为阳性后测序。得到的测序结果在 NCBI 上比对。

**1.7 Real-time PCR** 以羊 18S 基因作为参照基因,阴性对照以水代替模板 cDNA,使用 Quantitect SYBY GEEN 试剂 (Qiagen) 进行 Real-time PCR。Quantitative Real-Time PCR 反应体系为 20  $\mu$ l,其中 2  $\times$  SYBR premix 10  $\mu$ l、上下游引物各 0.5 pmol/L、cDNA 2  $\mu$ l、Rnase-free 水 7  $\mu$ l。扩增条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 15 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,55 个循环。

**1.8 统计分析** 每组重复 3 次。由 Light Cycler 2.0 自动给出相对定量表达结果,利用 SPSS 13.0 软件对上述基因 mRNA 表达量进行单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 目的基因标准曲线制备

**2.1.1 *Mater*、*GDF9*、*Dnmt1*、*Zar1* 的扩增结果** 对收集的绵羊卵母细胞模板进行 PCR 扩增,其 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳 (图 1) 检测。

对上述基因的扩增产物进行纯化、连接、转化以及扩菌,随后测序。测序结果与 NCBI 上的目的序列进行 BLAST 比对,结果显示本实验

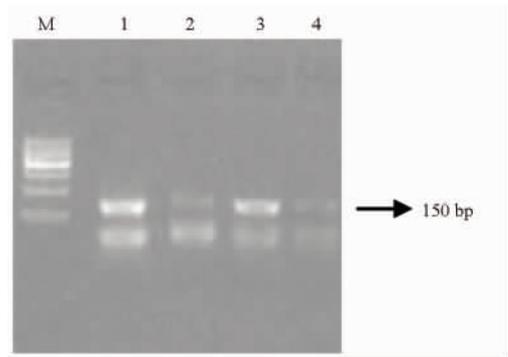


图 1 *Mater*、*GDF9*、*Dnmt1*、*Zar1* 在绵羊卵母细胞中的表达

Fig. 1 Expression of *Mater*, *GDF9*, *Dnmt1*, and *Zar1* in ovine oocytes

M. 100 bp DNA marker; 1. *Mater* (168 bp); 2. *GDF9* (198 bp); 3. *Dnmt1* (176 bp); 4. *Zar1* (168 bp).

获得的 *Mater*、*GDF9*、*Dnmt1* 和 *Zar1* 4 个基因片段的序列与 NCBI 上的 mRNA 序列同源性都是 100%。

**2.1.2 基因标准曲线制备** 将线性化产物纯化质粒按 1 ng/ $\mu$ l、100 pg/ $\mu$ l、10 pg/ $\mu$ l、1 pg/ $\mu$ l、100 fg/ $\mu$ l、10 fg/ $\mu$ l 和 1 fg/ $\mu$ l 7 个浓度进行梯度稀释,进行 Quantitative Real-Time PCR,生成各基因的标准曲线 (以 *Dnmt1* 为例,图 2)。

**2.2 基因熔解曲线** 熔解曲线是判断目的片段特异性的标准,每一对引物都具有固定的  $T_m$  值,因此使用同一对引物在相同扩增条件下,其目的片段的熔解曲线应该是一致的,如果出现不一致的情况,则表示出现了非特异性扩增,需要优化反应条件。基因熔解曲线见图 3 (以 *Dnmt1* 为例)。

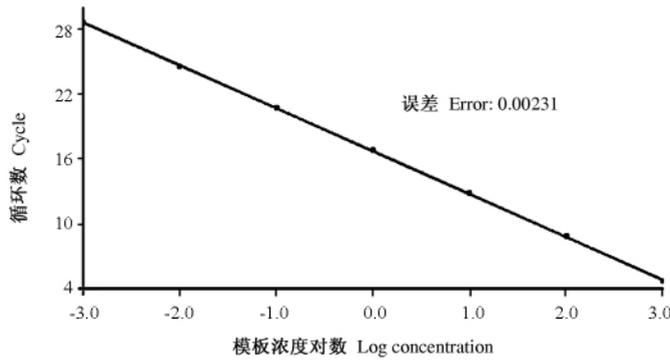


图2 *Dnmt1* 基因标准曲线图  
Fig. 2 Standard curve of *Dnmt1*

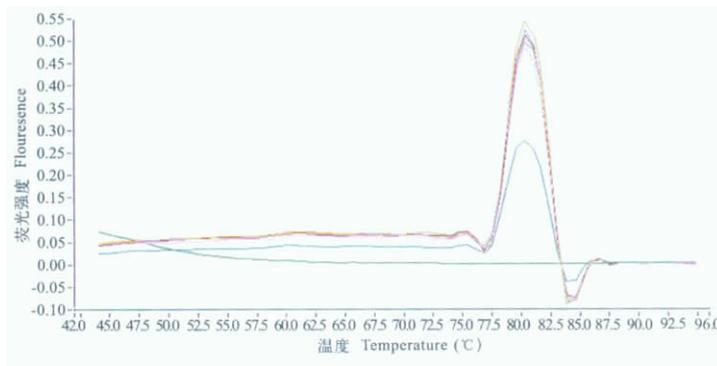


图3 *Dnmt1* 基因熔解曲线  
Fig. 3 Melting curve of *Dnmt1*

**2.3 *Mater*、*Zar1*、*Dnmt1* 及 *GDF9* 4 种母源 mRNA 在绵羊卵母细胞中的表达** 为了了解母源 mRNA 在卵母细胞表达量的动态变化,本研究采用 Quantitative Real-Time PCR 分析了卵母细胞成熟和老化过程 4 种母源基因 (*GDF9*, *Dnmt1*, *Mater*, *Zar1*) mRNA 表达水平。由图 4 可知,这 4 个基因的表达模式都是呈先下降再上升的趋势。其中 *GDF9* 和 *Mater* 这两个基因在 30 h 卵母细胞中的表达量显著高于 24 h ( $P < 0.05$ ),但都与 18 h 的差异不显著 ( $P > 0.05$ )。30 h 卵母细胞中 *Zar1* 和 *Dnmt1* 的转录水平与 24 h 卵母细胞差异不显著 ( $P > 0.05$ )。4 种基因都在 24 h 卵母细胞的表达量最低。

**2.4 咖啡因对绵羊老化卵母细胞母源 mRNA 水平的影响** 从图 5 可以看出,30 h 组的

*GDF9*、*Mater* 和 *Dnmt1* 3 个基因 mRNA 水平显著高于 24 h 组和咖啡因 + 24 h + 6 h 组 ( $P < 0.05$ );然而 24 h 组、30 h 组及咖啡因 + 24 h + 6 h 组这 3 组间 *Zar1* mRNA 水平差异不显著 ( $P > 0.05$ )。24 h 组的以上所有母源 mRNA 水平与咖啡因 + 24 h + 6 h 组间差异都不显著 ( $P > 0.05$ )。

**2.5 DTT 对绵羊老化卵母细胞母源 mRNA 水平的影响** 从图 6 中的数据可以看出,30 h 组的 *GDF9*、*Mater* 和 *Dnmt1* 3 个基因 mRNA 水平显著高于 24 h 组和 DTT + 24 h + 6 h 组 ( $P < 0.05$ )。 *Zar1* mRNA 水平在 24 h 组、30 h 组及 DTT + 24 h + 6 h 组这 3 组间无显著差异 ( $P > 0.05$ )。24 h 组和 DTT + 24 h + 6 h 组间的以上 4 种母源 mRNA 水平差异都不显著 ( $P > 0.05$ )。

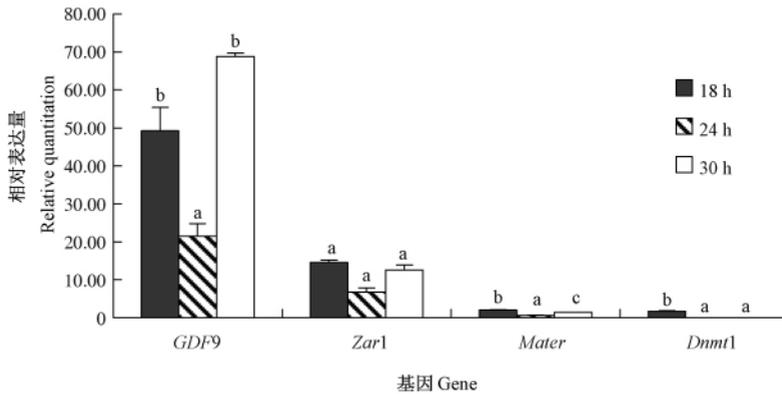


图 4 *GDF9* *Dnmt1* *Mater* *Zar1* mRNA 在绵羊卵母细胞的表达

Fig. 4 Relative expression of *GDF9* *Dnmt1* *Mater* and *Zar1* mRNAs in ovine oocytes

不同小写字母表示组间差异显著 ( $P < 0.05$ ), 下同。

a, b, c Values with different superscripts indicate significant deviation.

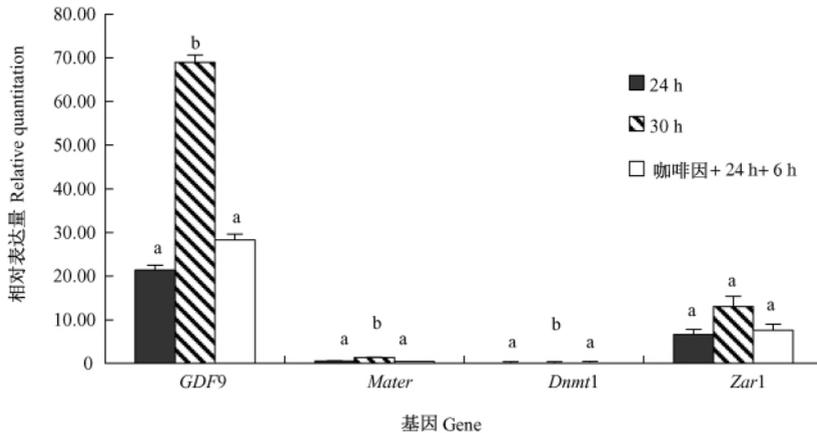


图 5 咖啡因对老化卵母细胞母源 mRNA 水平的影响

Fig. 5 Effect of caffeine on level of maternal mRNA in aged ovine oocytes

**2.6 硫酸盐对绵羊老化卵母细胞母源 mRNA 水平的影响** 图 7 中的结果显示 24 h 组、30 h 组及硫酸盐 + 21 h + 6 h 组这 3 组中硫酸盐 + 21 h + 6 h 组的 4 种母源 mRNA 水平都是最高, 其中硫酸盐 + 21 h + 6 h 组其 *GDF9*、*Mater* 和 *Dnmt1* 3 种 mRNA 水平都显著高于 24 h 组 ( $P < 0.05$ ), *GDF9* mRNA 水平显著高于 30 h 组 ( $P < 0.05$ )。 *Zar1* mRNA 水平在 3 组间差异不显著 ( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

#### 3.1 母源 mRNA 在绵羊卵母细胞中的表达

卵母细胞在老化过程中发生了一系列的理化特性改变,随之也发生了一些细胞核质事件的变化,从而引起卵母细胞质量下降,最终导致胚胎发育能力降低甚至死亡以及流产率增加<sup>[14-15]</sup>。以前有关卵母细胞老化的研究主要集中在形态学以及发育效率方面<sup>[16-17]</sup>,其中也有少量关于分子生物学方面的报道<sup>[18-19]</sup>,但至今尚未见到有关卵母细胞老化过程母源 mRNA 水平变化的报道。本实验研究了卵母细胞在成熟-老化过程中其母源基因表达量的变化情况(图 4),结果发现 *GDF9*、*Mater*、*Zar1*、*Dnmt1* 表达量都是呈先下降后上升的趋势,并且在成熟卵母细

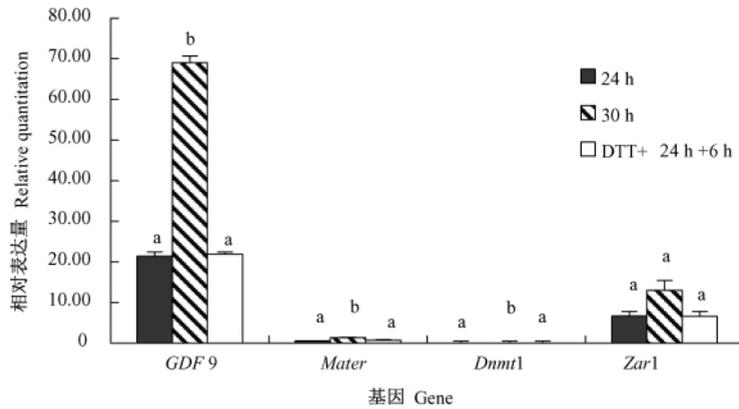


图 6 DTT 对老化卵母细胞母源 mRNA 水平的影响

Fig. 6 Effect of DTT on level of maternal mRNA in aged ovine oocytes

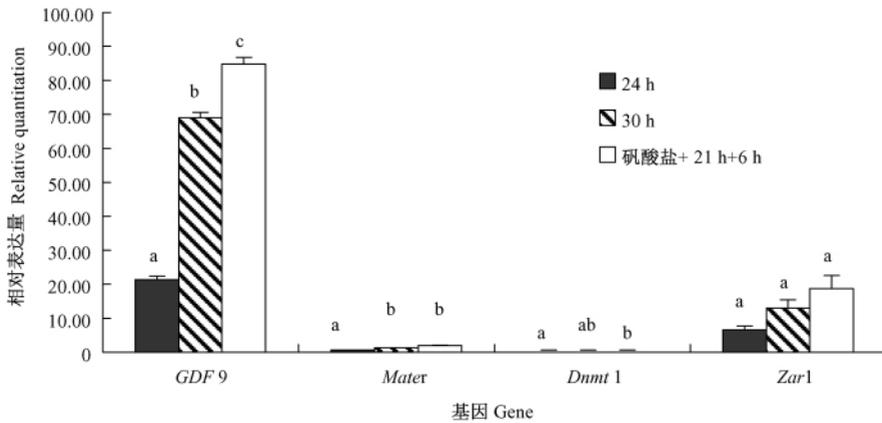


图 7 钒酸盐对老化卵母细胞母源 mRNA 水平的影响

Fig. 7 Effect of vanadate on level of maternal mRNA in aged ovine oocytes

胞(24 h)中的表达量最低。这可能是由于卵母细胞虽然在生长过程逐渐积累母源 mRNA 和蛋白,但随着卵母细胞的成熟,这些母源 mRNA 和蛋白积累的速度会降低,并且卵母细胞还会消耗一些母源 mRNA 和蛋白。当到达 M II 期时,卵母细胞已达到核质成熟,MPF 活性较高且具备受精和后期发育潜能,质量较好<sup>[15]</sup>,此时这些母源 mRNA 和蛋白降低到了一个临界点。这可能是由于在卵母细胞减数分裂成熟期多数母性 RNA 被降解,表达衰减<sup>[20]</sup>。当 M II 期卵母细胞发生老化时,细胞质与细胞核就会发生一系列相应的变化,MPF 活性下降,从而降低了卵母细胞质量<sup>[19]</sup>,此时由于质量较差的老化卵母细胞需要调节自身功能,通过提高母

源 mRNA 和蛋白的水平来维持细胞的存活,从而导致母源基因表达量的上升。但此时不管如何提高,也低于生长过程的母源基因表达量。当卵母细胞继续过度老化进而退化或死亡时,卵母细胞就再没有足够的的能力来启动这些母源 mRNA 和蛋白的合成及转录。因此,这些结果提示,母源基因的表达量与卵母细胞质量成反比。

3.2 药物对对老化卵母细胞母源 mRNA 水平的影响 哺乳动物卵母细胞老化不单会导致受精率降低,即使受精后发育而来的胚胎非整倍体率增高、妊娠流产率增加,而且也可能通过一些细胞/分子途径影响后代发育,出现初生体重较低、寿命短以及智力发育缓慢等负面现象。

因此寻求调控卵母细胞老化的方法就显得非常重要。研究表明,在培养基中添加某些药物可以不同程度地延缓卵母细胞老化进程,但主要是针对卵母细胞后期发育效率<sup>[11-12,21-22]</sup>,至今尚未见过药物影响卵母细胞母源基因表达量的报道。因此,本研究通过 Real-Time PCR 技术定量分析了绵羊卵母细胞老化前后以及经过咖啡因、DTT 和硫酸盐 3 种药物分别处理老化卵母细胞其母源 mRNA (*Mater*、*Zar1*、*Dnmt1*、*GDF9*) 表达量变化情况。

**3.2.1 咖啡因和 DTT 对老化卵母细胞母源 mRNA 水平的影响** 证据表明咖啡因可以延迟卵母细胞的老化过程,能提高绵羊老化卵母细胞经体细胞核移植后的重构胚质量和降低多精受精率<sup>[21-22]</sup>。咖啡因延长了猪 (*Sus scrofa domestica*) 卵母细胞处于生发泡期的减数分裂阻滞,能使培养 24 h 后的卵母细胞环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 水平显著升高。经过咖啡因处理后的卵母细胞在人工激活后,其囊胚率显著低于对照组<sup>[23]</sup>。DTT 能减轻由于老化引起的一些负面效应。DTT 能降低老化卵母细胞的孤雌激活率,升高 MPF 活性,减轻老化引起的受精 24 h 细胞碎片的出现和囊胚率降低的现象<sup>[24]</sup>。

由图 5 和图 6 的实验结果发现,老化卵母细胞表达的母源基因水平比成熟卵母细胞高 ( $P < 0.05$ ),然而老化卵母细胞经咖啡因或 DTT 处理后其母源基因表达量下降,但与成熟卵母细胞差异不显著 ( $P > 0.05$ )。其可能原因是,咖啡因和 DTT 通过使 MPF 活性升高从而改善卵母细胞的质量,继而引起母源基因表达量下降。虽然 *Zar1* 表达水平在 24 h 组、30 h 组、咖啡因处理组以及 DTT 处理组 4 组间差异不显著 ( $P > 0.05$ ),但其变化趋势还是与其他 3 个基因相似,都是老化卵母细胞中表达量最高,咖啡因和 DTT 都在一定程度降低了老化卵母细胞的 *Zar1* 表达量。这可能是由于 *Zar1* 转录水平在老化过程的变化幅度本来就比较平缓,而咖啡因或 DTT 对卵母细胞质量的改善主要是通过影响其他 3 个基因的表达来实现的,而

非 *Zar1*。结合图 4 中的结果可以得出一条结论:在培养基中添加咖啡因或 DTT 可以降低老化卵母细胞的母源基因表达量,改善老化卵母细胞的质量。

**3.2.2 硫酸盐对老化卵母细胞母源 mRNA 水平的影响** 硫酸盐是一个蛋白质酪氨酸磷酸酶抑制因子,能降低 MPF 的活性<sup>[25]</sup>。卵母细胞经硫酸盐处理后发生卵裂延迟,囊胚率下降,碎片率增加,cdc2 激酶活性下降,皮质颗粒胞吐以及 MPF 活性下降<sup>[26-27]</sup>。前期实验也证明硫酸盐降低了绵羊卵母细胞后期发育能力,加速了卵母细胞老化进程。

从图 7 中的数据可以看出,硫酸盐处理后的卵母细胞 4 种母源 mRNA 水平都是最高,其中除 *Zar1* 表达水平变化不显著外,其他 3 个基因 mRNA 水平都显著高于成熟卵母细胞 ( $P < 0.05$ )。前期实验证明,卵母细胞在体外培养至 30 h 才发生老化,而本实验中硫酸盐处理的卵母细胞体外培养至 27 h 的母源 mRNA 水平都在一定程度上高于老化卵母细胞的母源 mRNA 水平。这说明硫酸盐通过升高母源基因表达水平使老化卵母细胞的质量更加恶化,加速了老化进程。

综合前期实验结果,咖啡因和 DTT 能促进绵羊老化卵母细胞继续发育,而硫酸盐则降低了绵羊老化卵母细胞后续发育潜能,进一步证实咖啡因和 DTT 作为两种有效的抗氧化剂确实能在一定程度上延缓卵母细胞的老化进程,改善卵母细胞质量,而硫酸盐作为一种促老化药物则加速了卵母细胞老化。

## 4 结 论

本实验利用 Real-Time PCR 技术研究了绵羊卵母细胞在生长-成熟-老化过程其母源基因表达量发生的动态变化以及 3 种药物对老化卵母细胞母源基因表达量的影响,结果表明母源基因的表达量与卵母细胞质量成反比,咖啡因和 DTT 作为 2 种较为有效的抗氧化剂能在一定程度上延缓卵母细胞的衰老,改善卵母细胞质量;而硫酸盐则加速了卵母细胞老化进程,降

低了卵母细胞质量。由于咖啡因和 DTT 都能提高卵母细胞 MPF 活性,而硝酸盐使 MPF 活性降低,因此推测母源 mRNA 的转录水平可能与卵母细胞 MPF 活性有关,具体的关系还有待于进一步研究。

到目前为止,对母性基因在人类 (*Homo sapiens*) 中的作用还知之甚少,但逐渐增加的证据表明,人类卵巢中的母性因子在受精以后的生物学进程中发挥着关键的作用<sup>[6]</sup>,在寻求体外受精辅助生殖帮助的不孕妇女中,部分患者的卵母细胞在正常体外受精后出现不明原因的胚胎早期生长停滞,这种情况可能是由于某些卵母细胞发生老化或受精卵中缺乏早期发育必需的母性因子<sup>[28]</sup>。本研究从分子水平研究了咖啡因、DTT 和硝酸盐 3 种药物调节卵母细胞老化的分子机制,这可对卵母细胞体外成熟培养体系的优化、辅助生殖技术效率的提高提供理论基础。

## 参 考 文 献

- [1] 潘正军,陈忠科. 动物胚胎发育早期母源性基因表达研究进展. *生物学通报*, 2004, 39(9): 5-7.
- [2] Tong Z B, Gold L, Pfeifer K E, et al. *Mater*, a maternal effect gene required for early embryonic development in mice. *Nat Genet*, 2000, 26(3): 267-268.
- [3] Wu X, Viveiros M M, Eppig J J, et al. *Zygote arrest 1 (Zar1)* is a novel maternal-effect gene critical for the oocyte-to-embryo transition. *Nat Genet*, 2003, 33(2): 187-191.
- [4] Wilmot L, Schnieke A E, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, 385: 810-813.
- [5] 张莹,张秋芳,刘平. 母性效应基因 *Mater*、*Zar1* 的结构与功能. *生殖与避孕*, 2009, 29(1): 59-63.
- [6] 张鹏,石玉华,陈子江. 生长分化因子-9 及生长分化因子-9B/骨形态发生蛋白-45 与卵巢功能. *生殖与避孕*, 2007, 27(3): 204-208.
- [7] Gilchrist R B, Ritter L J, Armstrong D T. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim Reprod Sci*, 2004, 82/83: 431-436.
- [8] 彭宇洪,庄广伦,周灿权. 小鼠体外发育卵母细胞生长分化因子-9 基因表达. *南方医科大学学报*, 2006, 26(9): 1341-1345.
- [9] Sado T, Fenner M H, Tan S S, et al. X inactivation in the mouse embryo deficient for *dnmt1*: distinct effect of hypomethylation on imprinted and random X inactivation. *Dev Biol*, 2000, 225: 294-303.
- [10] Goud A P, Goud P T, Diamond M P, et al. Nitric oxide delays oocyte aging. *Biochemistry*, 2005, 44: 11361-11368.
- [11] Roth Z, Aroyo A, Yavin S, et al. The antioxidant epigallocatechin gallate (EGCG) moderates the deleterious effects of maternal hyperthermia on follicle-enclosed oocytes in mice. *Theriogenology*, 2008, 70: 887-897.
- [12] Tarin J J, Ten J, Vendrell F J, et al. Dithiothreitol prevents age-associated decrease in oocyte/conceptus viability *in vitro*. *Hum Reprod*, 1998, 13: 381-386.
- [13] Kikuchi K, Naito K, Noguchi J, et al. Maturation/M-phase promoting factor: a regulator of aging in porcine oocytes. *Biol Reprod*, 2000, 63(3): 715-722.
- [14] Tarin J J, Perez-Albala S, Aguilar A, et al. Long-term effects of postovulatory aging of mouse oocytes on offspring: a two-generational study. *Biol Reprod*, 1999, 61: 1347-1355.
- [15] Navot D, Bergh P A, Williams M, et al. Poor oocyte quality rather than implantation failure as a cause of age-related decline in female fertility. *Lancet*, 1991, 337: 1375-1377.
- [16] Von Wald T, Monisova Y, Hacker M R, et al. Age-related variations in follicular apolipoproteins may influence human oocyte maturation and fertility potential. *Fertil Steril*, 2009, 91: 8-8.
- [17] Ginther O J, Gasta M O I, Gastal E L, et al. Effects of age on follicle and hormone dynamics during the oestrous cycle in mares. *Reproduction, Fertility and Development*, 2008, 20: 955-963.
- [18] Tatone C, Amicarelli F, Carbone M C, et al. Cellular and molecular aspects of ovarian follicle ageing. *Human Reproduction Update*, 2008, 14(2): 131-142.
- [19] Miao Y L, Kikuchi K, Sun Q Y, et al. Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility. *Human Reproduction Update*, 2009, 15(1): 1-13.
- [20] Tong Z B, Gold L, de Pol A. Developmental expression and subcellular localization of mouse *Mater*, an oocyte-specific protein essential for early development. *Endocrinology*, 2004, 145(3): 1427-1434.
- [21] Lee J H, Campbell K H. Caffeine treatment prevents age-related changes in ovine oocytes and increases cell numbers in blastocysts produced by somatic cell nuclear transfer. *Cloning Stem Cells*, 2008, 10: 381-390.

- [22] Maalouf W E , Lee J H , Campbell K H. Effects of caffeine , cumulus cell removal and aging on polyspermy and embryo development on *in vitro* matured and fertilized ovine oocytes. *Theriogenology* ,2009 ,71 : 1083 - 1092.
- [23] Kren R , Ogushi S , Miyano T. Effect of caffeine on meiotic maturation of porcine oocytes. *Zygote* ,2004 ,12 (1) : 31 - 38.
- [24] Mao J , Wu G M , Prather R S , et al. Effect of methyl-beta-cyclodextrin treatment of pig spermatozoa on *in vitro* fertilization and embryo development in the absence or presence of caffeine. *Theriogenology* ,2005 ,64 (9) : 1913 - 1927.
- [25] Kikuchi K , Naito K , Noguchi J , et al. Maturation/M-phase promoting factor regulates aging of porcine oocytes matured *in vitro*. *Cloning Stem Cells* ,2002 ,4 : 211 - 222.
- [26] Tarin J J. Potential effects of age-associated oxidative stress on mammalian oocytes/embryos. *Mol Hum Reprod* ,1996 ,2 : 717 - 724.
- [27] Goren S , Dekel N. Maintenance of meiotic arrest by a phosphorylated p34cdc2 is independent of cyclic adenosine 3' ,5'-monophosphate. *Biol Reprod* ,1994 ,51 : 956 - 962.
- [28] Tong Z B , Bondy C A , Zhou J , et al. A human homologue of mouse Mater , maternal effect gene essential for early embryonic development. *Human Reproduction* ,2002 ,17 (4) : 903 - 911.