

蛋白质合成抑制剂亚胺环己酮 (CHX) 对猪卵母细胞体外成熟的影响*

李光鹏 孟庆刚 魏鹏 于元松 常仲乐 谭景和 **

(东北农业大学生物工程系, 哈尔滨 150030) (山东农业大学动物科技学院, 山东泰安 271018)

摘要 研究了蛋白质合成抑制剂亚胺环己酮 (CHX) 对猪卵母细胞体外成熟过程中的 GVBD、染色质凝集、M 期成熟及卵丘细胞扩展的作用。结果表明: (1) 培养液中添加 CHX, 可抑制卵母细胞 GVBD 的发生, 而且此作用是浓度依赖性的, 但 CHX 的抑制效果是完全可逆的; (2) 在含 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CHX 液中分别培养 0、6、12 和 24 h 后转入正常培养液再继续培养至 48 h, 卵母细胞成熟率分别为 84.1%、77.1%、48.9% 和 27.8%; (3) 正常培养液中培养 0、6、12、24、36 和 48 h 后, 再转入浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CHX 液中继续培养至 48 h, 卵母细胞成熟率分别为 0、0、0、31.3%、65.4% 和 79.5%; (4) CHX 对卵丘细胞扩展的影响随培养时间延长而增强, 在 CHX 中处理时间为 16 h 或更长, 完全抑制卵丘细胞的扩展。

关键词 猪 亚胺环己酮 卵母细胞 体外成熟 卵丘扩展

关于哺乳动物卵母细胞发育和成熟的机制, 至今尚了解不够。一般认为, 可以把卵母细胞生发泡破裂 (GVBD) 作为向成熟方向发育的标志。GVBD 的主要特征是染色质高度凝集, 核仁消失及核膜破裂等 (Kubelka *et al.*, 1988)。如果条件适宜, GVBD 一旦发生, 卵母细胞就将向着 M 发育并最终发育到 M 期、排出第一极体而达到成熟状态 (Motlik *et al.*, 1990; Taieb *et al.*, 1997)。亚胺环己酮 (cycloheximide, CHX) 是一种蛋白质合成抑制剂, 专门抑制肽链延长。有人证明, 在培养的不同时间加入 CHX, 得到的 GVBD 率有差异, 并认为在培养的前几个小时内的蛋白质合成和 RNA 转录是发生 GVBD 的先决条件 (Tatemoto *et al.*, 1995)。这些蛋白质的合成可能与促成成熟因子 (MPF) 的活性有关 (Kubelka *et al.*, 1995)。到目前为止, 人们的研究焦点主要集中于 CHX 对 GVBD 的影响, 而对其与 GVBD 后的继续发育能力的关系没有报道。本实验研究了 CHX 作用的时间和浓度以及在培养后不同时间加入 CHX 对猪卵母细胞核成熟和卵丘细胞扩展等的影响。

1 材料与方法

1999-05-18 收稿, 2000-11-09 修回

* 国家教委跨世纪优秀人才计划基金和黑龙江省杰出青年科学基金资助

** 通讯作者

第一作者简介 李光鹏, 男, 35, 博士, 副教授。现在中国科学院动物研究所计划生育生殖生物学国家重点实验室工作。E-mail:

guangpengli@Yahoo.com

1.1 卵母细胞收集与培养

自卵巢表面吸取 2~6 mm 卵泡中的卵丘卵母细胞复合体 (cumulus-oocyte complex, COC)。将洗涤后的 COC, 一部分直接移入 200 μl 培养滴进行培养, 另一部分则先用 0.1% 的透明质酸酶 (sigma) 液作用 30~60 s, 再用适当口径的微细吸管去除卵丘细胞, 使之成为裸卵, 然后进行培养。每一培养滴 (200 μl) 放 30 枚左右的卵母细胞。培养条件为 38.5~39 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 。

1.2 培养液

成熟培养液为 mTCM-199, 加入 10% (v/v) FCS (Sigma 公司), 10 IU/ml PMSG (宁波激素厂) 和 10% (v/v) pFF (自制)。在上述培养液中加入 CHX 就构成 CHX 培养液。

1.3 卵母细胞成熟鉴定

培养结束后, 将卵母细胞移入 0.1% 透明质酸酶液中处理 2~3 min, 脱除卵丘细胞, 常规技术压片, 固定, 染色。根据 Hunter 等 (1966) 的方法, 将卵母细胞成熟阶段分为 GV 期, GVBD, M 期, Ana / Tel 期和 M 期。由于 CHX 的作用, IPb 排出率明显下降。

1.4 试验设计

为了解 CHX 对猪卵母细胞体外成熟的作用,做了以下几个实验:(1)在正常培养条件下,猪卵母细胞成熟过程中核的动态变化规律;(2)不同浓度的 CHX 对猪卵母细胞成熟的作用;(3)在 CHX 液培养 24 h 后,转入正常培养液中 GVBD 发生情况;(4)正常培养后不同时间加入 CHX,检查对猪卵母细胞成熟率的影响。每组实验均重复 3 次以上。

1.5 数据分析

对所得数据用方差分析进行统计学处理。

2 结果

2.1 在正常培养液中培养卵母细胞核的成熟变化规律

选取形态良好的 COC 在正常成熟培养液中培养,在培养 0、12、24、30、36、40 和 48 h 后,分别进行压片,观察细胞核所处的时期,结果见表 1。

2.2 不同浓度的 CHX 对猪卵母细胞体外成熟的作用

随机将已经去除卵丘和具有完整卵丘的卵母细胞分别放入含有 0、0.1、1、10 和 50 $\mu\text{g/ml}$ CHX

的培养液中培养 24 h,结果见表 2。浓度为 1、10 和 50 $\mu\text{g/ml}$ 的 CHX 可以完全抑制卵母细胞发生 GVBD,其生发泡界限清晰,但其中的染色体已经开始凝集。因而,CHX 能抑制 GVBD,却不能阻止染色体凝集。CHX 浓度为 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 时,仍有约 10% 的卵母细胞发生 GVBD。

从表 2 还可以看出,CHX 的作用与卵丘细胞存在与否无关。

2.3 经含 CHX 的培养液培养 24 h 后, GVBD 发生情况

先将 COC 在含 10 $\mu\text{g/ml}$ CHX 的培养液中培养 24 h,用无 CHX 的培养液充分洗涤再转入正常培养液中培养。在转入正常培养液 0、2、3、4、6、8 和 12 h 后,观察 GVBD 情况,结果见表 3。

在含 CHX 的培养液培养 24 h 后,卵母细胞均处于 GV 期,但核内的染色质已经高度凝集,其凝集程度类似前中期状态。转入正常培养液后 4 h,就有 61.5% 的卵母细胞发生 GVBD;到 6 h 后,GVBD 率为 79.2%;到 8 h 后,GVBD 率为 72.7%,并有 22.7% 的卵处于 M 期。在培养 12 h 后,有 71.8% 发育到 M 期;培养 24 h 后,则有 27.8% 发育到 M 期。

表 1 在正常培养液中培养不同时间猪卵母细胞核的成熟变化

Table 1 Nuclear status of porcine oocytes at different time of culture in mTCM-199

培养时间 Time of culture (h)	观察卵数 No. of oocytes	细胞核发育时期 Status of nuclei					
		生发泡 (GV)	生发泡破裂 (GVBD)	中期 (M)	后/末期 (Ana / Tel)	中期 (M)	退化 (Degenerated)
0	57	53 (93.0) [*]					4 (7.0)
12	41	41 (100)					
24	31	3 (9.6)	25 (80.6) ^a	1 (3.2) ^c			2 (6.5) ^a
30	40	4 (10)	13 (32.5) ^b	18 (45) ^a	3 (7.5)		2 (5) ^a
36	90	0	7 (7.8) ^c	36 (40) ^a	22 (24.4) ^a	15 (16.7) ^c	10 (11.0) ^a
40	47				10 (21.3) ^a	32 (68.1) ^a	5 (10.6) ^a
48	61					51 (83.6) ^a	10 (11.1) ^a

*括号内的数字代表所占检查卵子数的 % (以下各表与此相同) a-b: $P < 0.05$ b-c: $P < 0.05$ a-c: $P < 0.01$

表 2 不同浓度的 CHX 对猪带卵丘和不带卵丘卵母细胞体外成熟的作用

Table 2 Effect of CHX on nuclear maturation of porcine oocytes with or without cumulus cultured for 24 h in vitro

卵丘细胞 Cumulus	CHX 浓度 Con. CHX ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	检查卵数 No of oocytes	核的状态 Status of nuclei		
			生发泡 (GV)	生发泡破裂 (GVBD)	退化 (Degenerated)
+	0	30	0	30 (100) ^a	0
-	0	30	0	28 (93.3) ^a	2 (6.7)
+	0.1	36	32 (88.9)	4 (11.1) ^c	
-	0.1	35	33 (94.2)	2 (5.8) ^c	
+	1	35	34 (97.1)		1 (2.9)
-	1	35	32 (91.4)		3 (8.6)
+	10	46	45 (97.8)		1 (2.2)
+	50	45	41 (91.1)		4 (8.9)

arc: $P < 0.01$

表 3 经含 CHX 培养液培养 24 h 后转入正常培养液猪卵母细胞 GVBD 发生情况

Table 3 Time of GVBD occurrence in pig oocytes after 24 h of CHX block

正常液培养时间 Cultural duration in normal medium (h)	观察卵数 Oocytes examined	生发泡 (GV)	生发泡破裂 (GVBD)	中期 (M)	中期 (M)	退化 (Degenerated)
0	21	21 (100) ^a				
2	23	23 (100) ^a				
3	27	26 (96.3) ^a	1 (3.7) ^c			
4	52	18 (34.6) ^c	32 (61.5) ^a			2 (3.8)
6	48	9 (18.8) ^c	38 (79.2) ^a			1 (2.0)
8	22	1 (4.5) ^c	16 (72.7) ^a	5 (22.7) ^c		
12	32	0	7 (21.9) ^b	23 (71.8) ^a		2 (6.3)
24	90	0	44 (48.9) ^a	10 (11.1) ^c	25 (27.8)	11 (12.2)

arc: $P < 0.01$

2.4 经过含 CHX 培养液培养不同时间后卵母细胞的成熟情况

在含 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ CHX 的成熟培养液中分别培养 0、6、12、24 和 48 h 后，转入正常培养液中再继续培养至 48 h，或者经 CHX 液培养 24 h 或 4 h 后，再转入正常培养液继续培养 48 h。结果，经 CHX 处理 6 h，卵母细胞成熟率为 77.1%，与对照组 (84.1%) 无显著差异。经过 12 h 或更长时间处理后，成熟率显著下降，而卵母细胞死亡率显著升高 (表 4)。

2.5 在培养不同时间加入 CHX 对猪卵母细胞成熟的影响

在正常培养液中分别培养 0、6、12、24、36 和 48 h 后，转入含 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ CHX 的培养液中继续培养至 48 h 卵母细胞的成熟变化见表 5。在培养 6 h 后加入 CHX，卵母细胞仍处于 GV 期 (91.9%)，无一发生 GVBD，与一直处于 CHX 中 48 h 的对照组 (92.5%) 相同。

在 12 h 后加入 CHX，有 32.7% 的卵母细胞发生 GVBD。在培养 24 h 后加入 CHX，成熟至 M 期的卵母细胞为 31.3%，大多数卵母细胞未能超过 M 期。在培养 36 h 后加 CHX，成熟率为 65.4%，显著低于正常培养组 (79.5%， $P < 0.01$)。

2.6 CHX 对卵丘细胞扩展的影响

实验中发现，CHX 对卵丘细胞的扩展及其程度有很大影响。在正常培养液中培养 24 h 或 36 h 后再转入 CHX 液培养，原来已扩展的卵丘细胞不再继续扩展，而且周边的颗粒细胞有回缩的迹象。

先经 CHX 液培养 4~6 h，再转入正常培养液培养，卵丘细胞的扩展不受影响，能达到 3~4 级 (分级标准参见 Daen *et al.*, 1994)。先经 CHX 液培养 12 h 再转入正常液培养 36 h 后，卵丘细胞的扩展程度仅相当于正常培养 24 h 的水平。而 CHX 液培养 16 h 后再转入正常培养，卵丘细胞不再扩展 (表 6)。

表 4 经 CHX 液培养不同时间再转入正常培养液培养卵母细胞的成熟情况

Table 4 Maturation of porcine oocytes after treated by CHX for different time

CHX 时间 Time in CHX (h)	正常液时间 Time in normal medium (h)	卵数 No. oocytes	核成熟状态 Nuclear status				
			生发泡 (GV)	生发泡破/中期 (GVBD - M)	后/末期 (Ana / Tel)	中期 (M)	退化 (Degenerated)
0	48	69	0	7 (10.1)	0	58 (84.1) ^a	4 (5.8)
6	42	70	0	11 (15.7)	0	54 (77.1) ^a	3 (4.3)
12	36	90	0	32 (35.6)	8 (8.9)	44 (48.9) ^b	6 (6.7)
24	24	90	0	44 (48.9)	10 (11.1)	25 (27.8) ^b	11 (12.2)
48	24	95	0	52 (54.7)	6 (6.3)	14 (14.7) ^c	23 (24.2)
24	48	48	0	18 (37.5)	0	15 (31.3) ^b	9 (18.7)
48	48	50	0	17 (34)	0	11 (22) ^c	22 (44)
24	0	32	32 (90.6)	0			3 (9.4)
48	0	33	33 (75.8)	0			8 (24.2)

a b: $P < 0.05$ b c: $P < 0.05$ a c: $P < 0.01$

表 5 于培养不同时间加入 CHX 对猪卵母细胞成熟的影响

Table 5 Effect of the initiation time for CHX treatment on the maturation of porcine oocytes

正常培养时间 Duration in normal medium (h)	CHX 培养时间 Duration in CHX (h)	卵数 No. oocytes	核的状态 Status of nuclei				
			生发泡 (GV)	生发泡破裂/中期 (GVBD - M)	后/末期 (Ana / Tel)	中期 (M)	退化 (Degenerated)
0	48	40	37 (92.5) ^a				
6	42	37	34 (91.9) ^a				
12	36	52	34 (65.4) ^b	17 (32.7) ^b			
24	24	64	0	34 (53.1) ^a	5 (7.8) ^a	20 (31.3) ^c	5 (7.8)
36	12	81	0	19 (23.5) ^b	4 (4.9) ^a	53 (65.4) ^b	5 (6.2)
48	0	78	0	0		62 (79.5) ^a	16 (20.5)

a b: $P < 0.05$ b c: $P < 0.05$ a c: $P < 0.01$

表 6 CHX 对卵丘细胞扩展的影响

Table 6 Effect of CHX on the cumulus expansion of porcine oocytes cultured in vitro

CHX 培养时间 Duration in CHX medium (h)	正常液培养时间 Duration in normal medium (h)	卵丘细胞扩展情况 Cumulus expansion
0	48	扩展至 3~4 级 (Expanded to degrees 3~4)
4	44	扩展至 3~4 级 (Expanded to degrees 3~4)
6	42	扩展至 3~4 级 (Expanded to degrees 3~4)
12	36	扩展至 2 级, 相当于正常 24 h 的水平 (Expanded to degree 2, corresponding to that matured for 24 h in normal medium)
16	32	无扩展 (No expansion)
24	24	无扩展 (No expansion)
24	48	无扩展 (No expansion)

3 讨论

3.1 CHX 抑制 GVBD

在牛、马、绵羊和山羊等卵母细胞体外培养时发现, 卵母细胞的成熟, 包括 GVBD、从 M 向 M 转变及 M 期的维持均需要新的蛋白质参与, 加入蛋白质合成抑制剂——亚胺环己酮 (CHX)

能抑制卵母细胞发生 GVBD, 使其处于 GV 状态 (Moor *et al.*, 1986; Hunter *et al.*, 1987; Sirard *et al.*, 1989; Kastrop *et al.*, 1991; Tatemoto *et al.*, 1995; Alm *et al.*, 1996)。本实验发现, 猪卵母细胞的 GVBD 也需要新的蛋白质合成。而且, CHX 的抑制效果有浓度依赖性作用。然而, CHX 不影响小鼠卵母细胞的 GVBD。这可能是由于小鼠

GV 期卵中已经存在有足量的发生 GVBD 所需的蛋白质 (Hashimoto *et al.*, 1988; Szollosi *et al.*, 1991), 而家畜 GV 期卵母细胞中尚不具备 (Alm *et al.*, 1996)。

本实验中, 猪卵母细胞在含 CHX 的培养液中培养 24 h 或 48 h 后, 仍维持在 GV 期, 但 CHX 的存在并不阻止核内染色质的凝集。染色质凝集过程不受 CHX 的影响的原因可能是, GVBD 和染色质凝集两个过程存在着不同的调节机制。或者是在 GV 期时卵内已经合成完染色质凝集因子的前体 (Kubelka *et al.*, 1995)。

有人认为, 卵母细胞成熟所需的蛋白质很可能就是细胞周期素 B (cyclin B)。在培养起始后的数小时内, 卵母细胞合成大量的周期素 B。周期素 B 与已经存在于卵内的 p34^{cdc2} 结合成复合体, 并以无活性的 MPF 前体 (pre-MPF) 形式存在。当 MPF 前体的数量达到阈值后, 受一系列激酶作用, 变为有活性的 MPF, 从而启动卵母细胞发生 GVBD (Taieb *et al.*, 1997; Levesque *et al.*, 1996)。本实验在解除 CHX 抑制转入正常培养液后, 大部分卵母细胞在 4~8 h 内就能完成 GVBD。这可能意味着在解除抑制后的 4~8 h 内, 猪卵母细胞就完成了 GVBD 所需的蛋白质 (可能是周期素 B) 的合成。

3.2 CHX 对猪卵母细胞成熟率的影响

到目前为止, 人们的研究焦点主要集中于 CHX 对体外成熟的卵母细胞 GVBD 的影响, 而对 GVBD 后卵母细胞的继续成熟能力的研究尚未见报道。本实验证明, 虽然 CHX 对卵母细胞 GVBD 的抑制是可逆的, 但解除抑制后卵母细胞继续成熟的

能力受到影响。在 CHX 液中处理 12、24 和 48 h 后再转入正常液继续培养 48 h, 其成熟率大大下降, 说明在 CHX 中培养超过 12 h 对猪卵母细胞的成熟有显著的不利影响。在牛, 只有在培养 12 h 以后加入 CHX, 卵母细胞才能成熟至 M 期 (Kastrop *et al.*, 1991)。这些事实说明, GVBD 后, 由 M 向 M 期进行时, 仍然需要新的蛋白质合成。这些蛋白质可能包括: 第一次减数分裂完成 (第一极体释放) 和第二次减数分裂恢复所需的蛋白质 (Alm *et al.*, 1996; Taieb *et al.*, 1997)。

3.3 CHX 对卵丘细胞扩展的影响

在排卵前夕, 卵丘细胞合成并沉积一种富含透明质酸的细胞间质。这种物质的积累使卵丘细胞扩展开来 (cumulus expansion)。在体内, 卵丘细胞的扩展有利于 COC 从卵泡壁分离下来而排卵。在体外培养条件下, 卵丘细胞同样发生扩展。卵丘细胞的扩展对于精卵结合及其后的合子发育具有重要意义 (Chen *et al.*, 1993; Vanderhyden *et al.*, 1993)。本实验结果说明, CHX 不仅对卵母细胞中蛋白质合成起抑制作用, 也对卵丘细胞的蛋白质合成起抑制作用, 因为它抑制卵丘扩展。据报道, PMSG 可以使卵丘细胞扩展, pFF 和 FCS 中均有促进卵丘扩展的因子 (Daen *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1994)。本实验中, 在用 CHX 处理 16 h 后, 即便培养于含 pFF、FCS 和 PMSG 的培养液中, COC 也不发生卵丘扩展。这意味着外源因子必须有内源因子作出应答才起作用, 也可能是这些物质的合成具有严格的阶段性。这也反映出, CHX 对猪卵丘细胞扩展的抑制是不可逆的。

参 考 文 献 (References)

- Alm, H. and K. Hinrichs 1996 Effect of cycloheximide on nuclear maturation of horse oocytes and its relation to initial cumulus morphology. *J. Reprod. Fert.* **107**: 215~220.
- Chen, L., S. J. T. Mao, L. R. McLean, R. W. Powers and W. J. Larsen 1994 Proteins of the inter-alpha trypsin inhibitor family stabilize the cumulus extracellular matrix through their direct binding with hyaluronic acid. *J. Biol. Chem.* **269**: 28 282~28 287.
- Chen, L., P. T. Russell and W. J. Larsen 1993 Functional significance of cumulus expansion in the mouse: roles for the preovulatory synthesis of hyaluronic acid within the cumulus mass. *Mol. Reprod. Dev.* **34**: 87~93.
- Daen, F. P., E. Sato, K. Natio and Y. Toyoda 1994 The effect of pig follicular fluid fractions on cumulus expansion and male pronucleus formation in porcine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *J. Reprod. Fert.* **101**: 667~673.
- Hashimoto, N. and T. Kishimoto 1988 Regulation of meiotic metaphase by a cytoplasmic maturation-promoting factor during mouse oocyte maturation. *Devel. Biol.* **126**: 242~252.
- Hunter, A. G. and R. M. Moor 1987 Stage-dependent effects of inhibiting ribonucleic acids and protein synthesis on meiotic maturation of bovine oocytes *in vitro*. *J. Dairy. Sci.* **70**: 1 646~1 651.
- Hunter, R. H. F. and C. Polge 1966 Maturation of follicular oocytes in the pig after injection of human chorionic gonadotrophin. *J. Reprod. Fert.* **12**: 525~531.

- Kastrop, P. M. M., S. C. J. Hulshof, M. M. Bevers, O. H. J. Destree and T. A. M. Kruij 1991 The effects of α -amanitin and cycloheximide on nuclear progression, protein synthesis, and phosphorylation during bovine oocyte maturation. *Mol. Reprod. Devel.* **28**: 249 ~ 254.
- Kubelka, M., J. Motlik, J. Jr. Fulka, R. Prochazka, Z. Rimkevicova and J. Fulka 1988 Time sequence of germinal vesicle breakdown in pig oocytes after cycloheximide and p-aminobenzamidine block. *Gamete Res.* **19**: 423 ~ 431.
- Kubelka, M., Z. Rimkevicova, P. Guerrier and J. Motlik 1995 Inhibition of protein synthesis affects histone H1 kinase, but not chromosome condensation activity, during the first meiotic division of pig oocytes. *Mol. Reprod. Devel.* **41**: 63 ~ 69.
- Levesque, J. T. and M. A. Sirard 1996 Resumption of meiosis is initiated by the accumulation of cyclin B in ovine oocytes. *Biol. Reprod.* **55**: 1 427 ~ 1 436.
- Moor, R. M. and I. M. Crosby 1986 Protein requirements for germinal vesicle breakdown in ovine oocytes. *J. Embryo. Exp. Morph.* **94**: 207 ~ 220.
- Motlik, J. And Z. Rimkevicova 1990 Combined effects of protein synthesis and phosphorylation inhibitors on maturation of mouse oocytes *in vitro*. *Mol. Reprod. Devel.* **27**: 230 ~ 234.
- Sirard, M. A., H. M. Florman, M. L. Leibfried-Rudledge, F. L. Barnes, M. L. Simons and N. L. First 1989 Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol. Reprod.* **40**: 1 257 ~ 1 263.
- Szollosi, M. S., P. Debey, D. Szollosi, H. Rime and D. Vautier 1991 Chromatin behaviour under influence of puromycin and 6-DMAP at different stages of mouse oocyte maturation. *Chromosoma* **100**: 339 ~ 354.
- Taieb, F., C. Thibier and C. Jessus 1997 On cyclins, oocytes, and eggs. *Mol. Reprod. Devel.* **48**: 397 ~ 411.
- Tatemoto, H. and T. Horiuchi 1995 Requirement for protein synthesis during the onset of meiosis in bovine oocytes and its involvement in the autocatalytic amplification of maturation-promoting factor. *Mol. Reprod. Devel.* **41**: 47 ~ 53.
- Vanderhyden, B. C. 1993 Species differences in the regulation of cumulus expansion by an oocyte-secreted factor (s). *J. Reprod. Fert.* **98**: 219 ~ 227.

外 文 摘 要 (Abstract)

EFFECTS OF CYCLOHEXIMIDE (CHX) ON IN VITRO MATURATION OF PORCINE OOCYTES*

LI Guang-Peng MENG Qing-Gang WEI Peng YU Yuan-Song
 CHANG Zhong-Le TAN Jing-He **

(Department of Biotechnology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

(College of Animal and Veterinary Sciences, Shandong Agricultural University, Taian 271018, Shandong, China)

Since it was reported that protein synthesis and RNA transcription during early hours of culture is essential for germinal vesicle breakdown (GVBD) in *in vitro* maturing oocytes, a series of experiments have been designed to study the effects of cycloheximide (CHX), an inhibitor of protein synthesis, on GVBD, condensation of chromatin, oocyte maturation to M stage and the cumulus expansion of porcine oocytes cultured *in vitro*.

Porcine cumulus-oocyte complexes (COCs) were aspirated with a syringe from the follicles of 2 ~ 6 mm in diameter on the ovarian surface and cultured in mTCM-199 containing 10% FCS, 10 IU/ml PMSG and 10% pFF, in an atmosphere of 5% CO₂ in air at 38.5 ~ 39 °C. Five experiments were conducted in this study. In experiment 1, the nuclear changes during maturation of oocytes cultured under normal conditions were observed. In experiment 2, effects of CHX concentration on oocyte maturation were studied. In experiment 3, oocytes were first cultured in medium containing CHX for 24 hours and then transferred to and cultured in normal maturation medium to study the effect of protein synthesis during first hours of culture on porcine oocyte GVBD. In experiment 4, oocytes were first cultured in CHX-containing medium for 0, 6, 12, 24 and 48

* This study was supported by grants from the Trans-century Talent Foundation of China Educational Commission and the Heilongjiang Provincial Foundation for Outstanding Young Scientists

** Corresponding author

hours before being transferred to and cultured in normal maturation medium up to 48 hours to study the effect of CHX during early hours of culture on oocyte maturation to M_{II} stage. In experiment 5, at different hours of culture in normal maturation medium, oocytes were transferred to and cultured in CHX-containing medium up to 48 hours to study effects of CHX during later hours of culture on oocyte maturation to M_{II} stage.

The results obtained were as follows: (1) GVBD was completely blocked when CHX was added at concentrations of 1, 10, or 50 $\mu\text{g/ml}$. However, GVBD occurred in some oocytes when CHX was at 0.1 $\mu\text{g/ml}$. The CHX inhibition of GVBD was fully reversible and once CHX was removed GVBD occurred very soon. When the COC was first cultured in the presence of 10 $\mu\text{g/ml}$ CHX for 24 h and then transferred to and cultured in normal medium (without CHX), GVBD occurred at 4~8 h, 3 to 6 times earlier than that occurred under normal condition (20~24 h); (2) When the COC was first cultured in the presence of CHX for 0, 6, 12 and 24 h, and then transferred into normal medium and continued to culture up to 48 h, the M_{II} maturation rates of oocytes were 84.1, 77.1, 48.9 and 27.8%, respectively; (3) When the COC was cultured in normal medium for 0, 6, 12, 24, 36 and 48 h, then cultured in CHX media up to 48 h, the maturation rates were 0, 0, 0, 31.3%, 65.4% and 79.5%, respectively. In summary, results 2 and 3 indicated that with extension of exposure to CHX, whether during early or late hours of culture, oocyte maturation to M_{II} stage was reduced markedly; (4) CHX inhibited the expansion of cumulus cells. Based on these results, we conclude that the GVBD and maturation to M_{II} stage of porcine oocytes needed *de novo* synthesis of proteins.

Key words Pig, Oocytes, *In vitro* maturation, Cumulus expansion, Cycloheximide