

# 猪卵母细胞体外成熟中膜电位 与成熟关系的研究

郝艳红 秦鹏春

(东北农业大学动物医学系, 150030)

**摘 要** 本文应用细胞内微电极技术, 分析测试了不同类别的猪卵母细胞, 在体外成熟中不同时期的膜电位。结果表明, 在体外成熟培养前, A类和B类未成熟卵母细胞的膜电位为较小的负值 ( $-8.97 \pm 0.5$ ,  $-1.55 \pm 0.6$  mV), C类则为较小的正值 ( $+2.40 \pm 0.3$  mV)。成熟培养后, 卵母细胞首先发生超极化, 随着培养时间的延长, 卵母细胞膜去极化并极性转化为正值。成熟卵母细胞的膜电位为正值 ( $+26.50 \pm 1.0$  mV)。本文还讨论了猪卵母细胞可能的体外成熟机理。

**关键词** 猪, 卵母细胞, 膜电位, 体外成熟

哺乳动物卵母细胞一直处于静止状态, 直到排卵前才开始恢复第一次成熟分裂, 此时卵核泡消失、染色体分裂、排出第一极体而进入第二次成熟分裂中期, 至此卵母细胞成熟。此过程是极为复杂的生命现象, 是受精所必须的条件。业已证明, 猪未成熟卵母细胞(卵巢卵母细胞)在体外培养条件下, 具有能自发发生减数分裂的成熟能力。哺乳动物卵母细胞的膜电位与其成熟有关。Cross (1973)<sup>[1]</sup>首次证明小白鼠未成熟卵母细胞的膜电位为较小的负值 ( $-8.30 \pm 0.8$  mV), 成熟卵母细胞的膜电位为正值 ( $+1.50 \pm 0.1$  mV)。此结果得到 Hagiwara (1979)<sup>[2]</sup>等学者的进一步证实。Meculloh (1983)<sup>[3]</sup>在家兔的研究中也证实了这一结果。关于哺乳动物卵母细胞膜电位与成熟的关系, 国外虽有报道, 但还不够系统和深入, 尤其在家畜的研究仍属空白。为此, 本文对不同类别猪卵母细胞体外成熟中不同时期的膜电位及其与成熟之间的关系进行了较全面系统的研究, 并讨论了猪卵母细胞膜电位的产生机理, 旨在为猪卵母细胞体外成熟机理和体外成熟培养研究提供有价值的基础资料。

## 1 材料与方 法

**1.1 卵母细胞的收集和体外成熟培养** 从东北地方猪卵巢内 2~8 mm 直径的卵泡中吸取卵母细胞, 经 50 g 的速度离心 3 min, 弃去上清液, 将卵母细胞移入洗卵液, 洗涤 3 次后于实体显微镜下检出卵母细胞, 去掉胞质不均匀、发白卵(数量不多), 然后将胞质均匀的正常卵母细胞进行分类培养。采用 TC-199 培养液, 在 39°C、5% CO<sub>2</sub>+95% 空气、饱和湿度的二氧化碳培养箱中培养。分别选取不同培养时期的 3 类卵母细胞进行测试。

**1.2 卵母细胞的分类** 据卵母细胞周围卵丘细胞的数量和形态特点分为 3 类: A 类有 5 层以上卵丘细胞包围, 且排列紧密; B 类卵丘细胞较少, 在 5 层以下; C 类无卵丘细胞包围或只有少数卵丘细胞分散排列的裸卵。

• 收稿日期 1994-04-19。

1.3 卵母细胞成熟的判定标准 在卵母细胞的胞质中见到处于第二次成熟分裂中期(M II)的染色体和第一极体的细胞核或染色体。

1.4 膜电位的测试 微电极制备<sup>[4]</sup>是选用外径 1.6mm 的玻璃微电极细坯,用 WLQ-Z 型自动多管微电极控制器拉制成尖端直径 $\leq 1\mu\text{m}$ 的微玻管,再将管体弯成“Z”型,充灌 3 mol/L KCl 溶液,内装氯化银丝。电极电阻为 10~20M $\Omega$ 。选用外径 1.3mm,长120mm 的细玻管拉制成锥形玻璃针,再用锻烧仪截断并烧至圆钝,制成内口径为 30~40 $\mu\text{m}$ ,外径为 100~120 $\mu\text{m}$  的猪卵母细胞固定吸管。待测卵母细胞置于培养滴中用固定吸管固定。通过显微操做仪调节微电极,并将电极刺入卵母细胞内,经微电极将膜电位信号输入 WFZ-87 型双路多功能直流放大器内,显示膜电位数值。测试过程在屏蔽室中进行。

## 2 结果

### 2.1 体外成熟前后 3 类卵母细胞的膜电位与体外成熟率

本实验分类测试和统计学(t 检验)分析结果表明,3 类未成熟卵母细胞的膜电位有极显著差异( $P < 0.01$ ),体外成熟后这种差异依然存在,且 3 类卵母细胞的体外成熟率也有极显著差异(见表 1)。

表 1 3 类卵母细胞的膜电位与成熟率

Table 1 The membrane potential (MP) and the *in vitro* maturation (IVM) rate

类别 Class	膜电位 ( $\bar{X} \pm SD$ ) MP (mV)		成熟率 (%) IVM rate
	未成熟卵母细胞 (卵数) Unmatured oocytes (NO.)	成熟卵母细胞 (卵数) Matured oocytes (NO.)	
A	-8.97 $\pm$ 0.5 (9)	+26.50 $\pm$ 1.0 (10)	93.7%
B	-1.55 $\pm$ 0.6** (12)	+31.70 $\pm$ 1.1** (13)	43.7%**
C	+2.40 $\pm$ 0.3* (13)	+10.50 $\pm$ 0.9** (14)	11.1%**

样本数: N = 71 \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

No. of sample: N = 71 \*MP values are significant ( $P < 0.05$ ) between the classes.

\*\*MP values are very significant ( $P < 0.01$ ) between the classes.

### 2.2 猪卵母细胞体外成熟中不同时间的膜电位

测试结果表明, A 和 B 类卵母细胞的膜电位在成熟培养前为较小负值,成熟培养 18 h 其膜电位超极化,随着培养时间的延长膜电位去极化并发生极性转化,由负值转化为正值。3 类卵母细胞在成熟培养 36 h 之前的膜电位变化趋势一致,之后则出现差异(见表 2)。

## 3 讨论

3.1 猪卵母细胞膜电位与成熟的关系 本研究结果表明: 3 类未成熟卵母细胞的膜电位差异显著,反映其成熟情况也有显著差异。近年来很多学者都试图查明卵丘细胞群状态与卵母

表 2 培养不同时间的膜电位  
Table 2 MP of IVM at different time of incubation

类别 Class	培养前 (卵数) Pre-IVM culture (NO)	培养后 (卵数) Post-IVM culture (NO)			
		18 h	24 h	36 h	50 h
A	$-8.97 \pm 0.05(9)$	$-46.40 \pm 1.7^{**}(9)$	$+10.60 \pm 1.0^{**}(7)$	$+26.50 \pm 1.0(10)$	$+26.40 \pm 1.1(8)$
B	$-1.55 \pm 0.6(12)$	$-11.83 \pm 1.2^{**}(10)$	$+14.90 \pm 1.0^{**}(7)$	$+31.70 \pm 1.1^{*}(13)$	$+14.0 \pm 1.4^{*}(9)$
C	$+2.40 \pm 0.3(13)$	$+1.25 \pm 1.3(10)$	$+4.30 \pm 0.5(8)$	$+10.50 \pm 0.9(14)$	$+24.50 \pm 1.1^{**}(8)$

样本数: N = 150 \* P < 0.05, \*\* P < 0.01.

NO. of sample: N = 150 \*: MP Significant (P < 0.05) between pre-and post-time, \*\*: MP very significant (P < 0.01) between pre-and post-time.

细胞成熟的关系, 结果证明, 卵丘细胞群完整的卵母细胞 (A类) 其成熟效果显著高于少丘卵 (B类) 和裸卵 (C类)<sup>[5]</sup>。这与本研究的膜电位反映的结果完全一致。本研究还发现, A类卵母细胞是最理想的体外成熟培养材料, B类和C类则需适当改善培养条件后利用。Steinhardt (1977)<sup>[6]</sup>在海胆卵母细胞的培养液中加入钙离子载体 A 23187, 结果使卵母细胞膜去极化, 加速了卵母细胞的成熟进程; 若加入  $Ba^{2+}$ , 结果使老化的卵母细胞膜复极化, 使卵母细胞膜电位保持在成熟卵母细胞的水平<sup>[3]</sup>, 延缓了老化。提示我们利用膜电位为生理指标来调控卵母细胞的成熟进程是很有实际应用价值的。

**3.2 卵母细胞在体外成熟中不同时间的膜电位变化及其产生机理** 本研究发现猪卵母细胞在体外成熟中膜电位自发出现规律性变化。这与小白鼠<sup>[1]</sup>、家兔<sup>[3]</sup>研究结果一致。有学者认为动物未成熟卵母细胞的膜电位产生与  $K^{+}$  有关<sup>[1-3]</sup>, 并推论其产生机理与动物可兴奋细胞膜电位产生机理相似<sup>[2]</sup>。诸多学者研究证明, 哺乳动物卵母细胞成熟过程伴随出现膜对  $K^{+}$  通透性降低<sup>[3]</sup>, 而对钙离子通透性增高<sup>[6]</sup>, 猪卵母细胞在体外成熟后钙含量显著增加<sup>[7]</sup>。由此推论, 猪卵母细胞体外成熟中由于某种内源性刺激使膜上电压敏感性钙通道开放, 钙离子内流而致膜去极化, 随着钙离子内流增加, 细胞膜去极化并发生极性转化, 由负值转为正值, 此时卵母细胞完成成熟过程。可见, 钙离子在猪卵母细胞成熟中起着极为重要的作用。而钙离子活动则跟与膜电位有关的电压敏感性钙通道活动有关。

## 参 考 文 献

- [1] Cross M H et al. Changes in membrane potential during mouse eeg development. Dev. Biol. 1973, 33:413~416.
- [2] Hagiwara S. Electrical properties of eeg cell membranes. Annu. Rev. Biophys. Bioeng. 1979, 8: 385~416.
- [3] Meculloh D H. Insemination of rabbit eegs is associated with slow depolarization and repetitive diphase membrane potential. Dev. Biol. 1983, 95:372~377.
- [4] Purvers R D (刘克球译). 微电极方法. 北京大学出版社, 1985, 14~26.
- [5] 梁冠生等. 猪卵母细胞体外成熟的研究. 兽医大学学报, 1991, 11(4):383~385.
- [6] Steinhart P. Intracellular calcium releas at fertilization in the sea urchin eeg. Dev. Biol. 1977, 58:185~196.
- [7] 冯怀亮等. 猪体外受精中钙调机理研究. 兽医大学学报, 1993, 13(1):7~11.

**STUDIES ON THE RELATIONSHIP OF THE MEMBRANE  
POTENTIAL AND THE MATURATION OF PIG  
OOCYTES *IN VITRO* MATURATION**

Hao Yanhong, Qin Pengchun

(Northeast Agricultural University)

**Abstract**

The membrane potential values and the relationship of maturation and membrane potential of pig oocytes, which came from different classes and time of *in vitro* maturation, had been tested with intracellular microelectrode technique. The results showed that the membrane potential values of class A and B oocytes were the small and negative ( $-8.97 \pm 0.5$ ,  $-1.55 \pm 0.6$  mV), and class C were small and positive ( $+2.40 \pm 0.3$  mV). First, the oocytes over-polarized, then as the maturation of oocytes went on, their membrane potential values of the maturation oocytes became positive ( $+26.50 \pm 1.0$  mV). And the probable maturation mechanism was discussed.

**Key words** Pig, Oocytes, Membrane potential, *In vitro* maturation