

亚胺环己酮对猪卵母细胞人工孤雌激活作用的研究

李光鹏, 孟庆刚, 魏 鹏, 李子义, 孙兴参, 谭景和

(东北农业大学生物工程系, 哈尔滨 150030)

摘 要: 本文以体外成熟的猪卵母细胞为材料, 以乙醇、电脉冲和氯化锶为人工刺激条件, 研究了蛋白质合成抑制剂——亚胺环己酮(CHX)对猪卵母细胞的孤雌激活效果的影响。结果表明, 乙醇、电脉冲和 SrCl₂ 均可使猪卵母细胞激活, 而电脉冲的激活效果最好。当分别与 CHX 联合使用时, 激活率显著高于单独的乙醇、电脉冲或 SrCl₂ 刺激。说明, CHX 与乙醇、电脉冲及 SrCl₂ 联合使用对猪 IVM 卵母细胞激活具有显著的协同促进作用。

关键词: 亚胺环己酮(CHX); 孤雌激活; 卵母细胞; 猪

中图分类号: S828.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0366-6964(2001)05-0416-05

进行卵母细胞激活是细胞核移植的关键技术环节, 也是研究哺乳动物孤雌生殖及受精机制的重要手段之一。自然条件下, 卵子激活是由精子穿入刺激引起的。有许多人工方法如乙醇、电脉冲、磷酸肌醇脂和钙离子载体 A23187 等均可使小鼠、牛、仓鼠、大鼠、猪等的卵母细胞发生孤雌激活^[1-5]。但有关猪体外成熟卵母细胞孤雌激活的研究尚不够深入。因此, 本文以体外成熟的猪卵母细胞为材料, 以乙醇、电脉冲和氯化锶为人工刺激条件, 研究了蛋白质合成抑制剂——亚胺环己酮(cycloheximide, CHX)对猪卵母细胞的孤雌激活效果的影响。

1 材料和方法

1.1 卵母细胞的收集和培养

自卵巢表面直径为 2~6mm 的卵泡中抽取卵母细胞, 选择具致密颗粒细胞的卵丘卵母细胞复合体(Cumulus-enclosed oocyte complexes, COC)在改进的 TCM-199 培养液(mTCM-199: 含 Earle's 盐和 PMSG、FCS、pFF 等)中培养 44~48 h^[6]。其中, 在培养 24h 时换掉 3/4 液体代之以无激素的培养液。培养结束后, 选择形态良好且具有第一极体的卵母细胞进行激活处理。

1.2 卵母细胞激活

1.2.1 乙醇激活: 将卵母细胞作以下处理: (1) 在含有不同浓度乙醇的 TCM-199(不含激素和 pFF)中处理 5 min, 再放入基础培养液(含 Earle's 盐, 不含激素和 pFF 的 199 培养液)中培养 20 h; (2) 直接放入含不同浓度 CHX 的培养液中培养 20 h; (3) 先经乙醇液处理 5 min, 再转入含 10 μg/ml CHX 的培养液中培养 20 h。

1.2.2 电脉冲激活: 将卵母细胞放入 0.3 mol/L 甘露醇融合液中(含 0.1 mol/L MgSO₄, 0.05

收稿日期: 2000-03-06

基金项目: 国家教委跨世纪优秀人才计划基金(1994)和黑龙江省杰出青年科学基金(1995)资助项目

作者简介: 李光鹏(1965-), 男, 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。

mol/L CaCl_2) 平衡 2 min, 然后移至间距为 1 mm 的电极间, 进行电脉冲刺激(美国 BTX 公司生产的 ECM2001 型电融合仪)。电刺激之后, 静置 1~2 min, 将卵母细胞吸至基础培养液洗涤数次并在其中继续培养 20 h。对照组除不经电刺激外, 其他处理同试验组。

1.2.3 SrCl_2 激活: 随机吸取卵母细胞进行下述处理: (1) 在 0.6、5.0 和 10.0 mmol/L 的 SrCl_2 激活液(用无钙 M16 配制, 李光鹏等, 1998)^[7] 中作用 60 min, 洗涤后转入基础培养液培养 20 h; (2) 先经 1.6 mmol/L SrCl_2 激活液分别作用 0.5、1.0、2.0、3.0 h, 再转入含或不含 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CHX 的 TCM-199 中培养 20 h。

1.3 激活鉴定 培养结束后进行压片并在乙醇冰醋酸(3:1)固定液中固定 72 h 以上, 再经 1% 的醋酸地衣红染色 1~2 min, 在相差显微镜下观察激活情况。判断卵母细胞激活的标准是形成一个原核(1PN)、两个原核(2PN)或出现两个极体(2Pb)。

1.4 数据分析 利用 t-检验及方差分析对数据做统计学分析。

2 结果

2.1 CHX 在乙醇诱导猪 IVM 卵母细胞孤雌激活中的作用

经含 0.3%、5%、10% 和 15% 乙醇的培养液中作用 5 min, 激活率分别为 0.0、2.5%、9.3% 和 11.9%。5%、10% 和 15% 的乙醇处理卵母细胞的激活率无显著差异, 但卵母细胞的死亡率却有显著差异, 分别为 7.5%、14.8% 和 33.8% ($P < 0.05$) (数据未列出)。经含 0.5、10 和 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CHX 的 TCM-199 中培养 20 h 后, 所有卵母细胞无一激活。而经乙醇(10%) 与 CHX 联合处理后, 卵母细胞激活率可达 27.8%, 显著高于单独的乙醇处理(6.7%) ($P < 0.05$)。

2.2 CHX 在电脉冲诱导猪 IVM 卵母细胞孤雌激活中的作用

2.2.1 不同电脉冲强度对猪 IVM 卵母细胞的激活: 用 30 μs 和 100 μs 2 个脉冲持续时间, 分别与 0.6、0.8、1.0、1.5、1.8 和 2.0 kV/cm 的脉冲场强结合, 对 IVM 44~48 h 的猪卵母细胞进行一次电脉冲刺激, 结果见表 1。1.5 kV/cm 和 30 μs 、0.8 kV/cm 和 100 μs 、1.0 kV/cm 和 100 μs 组合得到的激活率显著高于其它组合 ($P < 0.05$ 或 0.01)。用 1.2 kV/cm 场强, 分别以 30、40、60、100 和 200 μs 的持续时间进行刺激, 持续时间为 30 μs 、40 μs 和 60 μs 时的激活率(分别为 56.8%、56.4% 和 61.3%) 显著高于持续时间为 100 μs 和 200 μs (分别为 44.4% 和 33.3%, $P < 0.05$)。随脉冲持续时间的延长, 2PN 出现的比率升高。对照组卵母细胞无一激活。

2.2.2 CHX 与电脉冲联合使用对猪 IVM 卵母细胞孤雌激活的作用: 将卵母细胞先经 1.2 kV/cm 30 μs 电脉冲刺激后, 再经含有 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CHX 的 TCM-199 培养液培养 20 h。结果, 只经 CHX 处理不能使猪 IVM 卵母细胞激活, 但当与电脉冲联合使用时, 激活率(81.1%) 显著高于单独使用电脉冲获得的激活率(58.8%, $P < 0.05$), 见表 2。

2.3 亚胺环己酮在氯化锶诱导猪 IVM 卵母细胞孤雌激活中的作用

预实验表明, 经 0.6、5.0 和 10.0 mmol/L SrCl_2 的激活液中作用 60 min 后, 卵母细胞的激活率分别为 0.34.5%、41.9% 和 30%。5.0 和 10.0 mmol/L SrCl_2 处理均导致较高的死亡率(分别为 23.3% 和 44.3%), 显著高于 1.6 mmol/L 处理组。因而采用 1.6 mmol/L SrCl_2 的激活液。

表1 不同场强一次电脉冲刺激猪IVM卵母细胞的激活结果

Table 1 Activation of porcine IVM oocytes treated with one pulse of different strengths

脉冲场强 Strength (kV/cm)	持续时间 Duration (μ s)	处理卵数 No. oocytes treated	激活卵数 No. oocytes Activated(%)	激活卵核的状态 Status of pronuclei(%)		死亡卵数 No. oocytes lysed(%)
				1PN	2PN	
0.8	30	28	4(14.3) ^b	4(100) ^a	0	8(28.6) ^a
	100	31	17(54.8) ^a	14(82.4) ^a	3(17.6)	6(19.4) ^a
1.0	30	34	9(26.5) ^b	9(100) ^a	0	5(14.7) ^b
	100	36	21(58.3) ^a	17(80.9) ^a	7(19.4)	5(13.9) ^b
1.2	30	151	87(57.6) ^a	75(86.2) ^a	12(13.7) ^b	33(21.8) ^{ab}
1.2	40	117	66(56.4) ^a	63(95.5) ^a	3(4.5) ^b	24(20.5) ^{ab}
1.2	60	132	81(61.3) ^a	69(85.2) ^a	12(14.8) ^b	24(18.2) ^b
1.2	100	126	56(44.4) ^b	44(78.6) ^a	12(21.4) ^b	42(33.3) ^a
1.2	200	72	24(33.3) ^b	18(75) ^a	6(25) ^b	34(47.2) ^a
1.5	30	56	40(71.4) ^a	31(77.5) ^{ab}	9(22.5)	16(28.6) ^a
	100	24	14(58.3) ^a	13(92.9) ^a	1(7.1)	5(20.8) ^{ab}
1.8	30	32	18(56.3) ^a	12(66.7) ^b	6(33.3)	12(37.5) ^a
	100	27	10(37.0) ^b	6(60) ^b	4(40)	10(37.0) ^a
2.0	30	26	14(53.8) ^a	10(71.4) ^b	4(28.6)	10(38.5) ^a
	100	15	7(46.7) ^a	4(57.1) ^b	3(42.9)	8(53.3) ^a
对照组 Control		86	0			8(14.3) ^b

a: b 及 b: c, $P < 0.05$; a: c, $P < 0.01$

表2 电脉冲与CHX结合使用对猪IVM卵母细胞的激活

Table 2 Activation of porcine IVM oocytes treated with electrical pulses and cultured in the medium containing CHX

处理方法 Treatment		处理卵数 No. oocytes treated	激活卵数 No. oocytes activated (%)	核的激活状态 Status of pronuclei (%)		死亡卵数 No. oocytes lysed(%)
Pulse	CHX			1PN	2PN	
-	+	45	0			3(6.7)
+	-	51	30(58.8) ^b	23(76.7) ^a	7(23.3) ^a	7(13.7)
+	+	53	43(81.1) ^a	33(76.7) ^a	10(23.3) ^a	3(5.7)
-	-	36	0			4(11.1)

a: b, $P < 0.05$ 表3 SrCl₂与CHX联合使用对猪IVM卵母细胞的激活结果Table 3 Activation of porcine IVM oocytes treated with SrCl₂ combined with CHX

SrCl ₂ 作用时间 Exposure to SrCl ₂ (h)	CHX	处理卵数 No. oocytes treated	激活卵数 No. oocytes activated(%)	激活类型 Class of parthenogene(%)	
				1PN	2PN
0	+	39	0	0	0
	-	33	0	0	0
0.5	+	83	45(54.2) ^a	40(88.9) ^a	5(11.1) ^b
	-	76	21(27.6) ^c	21(100) ^a	0
1	+	77	51(66.2) ^a	44(86.3) ^a	7(13.7) ^a
	-	65	24(36.9) ^c	23(95.8) ^a	1(4.2) ^b
2	+	67	45(67.2) ^a	36(80) ^a	9(20) ^a
	-	95	47(49.5) ^c	42(89.4) ^a	5(10.6) ^b
3	+	55	41(74.5) ^a	34(82.9) ^a	7(17.1) ^a
	-	57	30(52.6) ^c	24(80) ^a	6(20) ^a

同一处理时间, a: b, $P < 0.05$; a: c, $P < 0.01$

将卵母细胞经含 1.6 mmol/L SrCl₂ 的激活液作用 0、0.5、1.2 和 3 h 后, 分别培养于 TCM-199 和含 10 μg/ml CHX 的 TCM-199 培养液中, 实验分组及激活结果见表 3。CHX 与 SrCl₂ 二者联合使用后的卵母细胞激活率显著高于 ($P < 0.01$) 仅使用 SrCl₂ 处理组的。

3 讨 论

本实验研究了乙醇、电脉冲和氯化锶对猪卵母细胞的激活作用。单独使用乙醇对猪 IVM 卵母细胞进行激活效果较差, 即使是 10%、15% 的乙醇, 激活率也只有 9.3% 和 11.9%。与 Didion 等(1990) 和 Petr 等(1996) 的报道相似^[8,9]。单独使用 CHX, 浓度从 5 μg/ml 至 100 μg/ml 均未能使猪 IVM 卵激活。单独使用 CHX 也不能使中国仓鼠卵母细胞激活^[2], 但可以使小鼠和牛的部分卵母细胞激活^[7,10]。乙醇与 CHX 结合使用, 可显著提高卵母细胞的激活率。电脉冲与 CHX 联合使用也大大提高了猪卵母细胞的激活率(81.8%), 显著高于单独使用电脉冲刺激(58.8%, $P < 0.01$), 与牛中的现象类似^[3,11]。应用 SrCl₂ 对家畜卵母细胞进行孤雌激活至今尚未见报道。本实验中, 用 1.6 mmol/L 的 SrCl₂ 作用猪卵母细胞 2~4 h, 激活率基本一致, 但随作用时间延长, 死亡率显著增加。同乙醇和电脉冲相似, SrCl₂ 与 CHX 结合使用对猪卵母细胞的激活有协同促进作用。

关于 SrCl₂ 引起卵母细胞的孤雌激活的机制, O'Neill 等(1991) 认为 Sr²⁺ 作为与 Ca²⁺ 同族的二价阳离子, 可能是通过细胞膜上的 Ca²⁺ 离子通道进入细胞内, 并进入钙库(内质网和线粒体等), 置换出内源 Ca²⁺, 释放入胞质中, 使胞内游离的 Ca²⁺ 增加, 进而介导了依赖 Ca²⁺ 的皮质反应^[12]。引起 cyclin B 降解, 导致 MPF 水平下降或失活, 从而使卵母细胞离开 M 期, 继续完成减数分裂, 排出第二极体, 并发育成原核和进一步发育。已经有人证明, Sr²⁺ 的刺激能引起卵母细胞质内 Ca²⁺ 发生多次波动性升高^[13]。

已经证明, 哺乳动物卵母细胞 M II 期的维持与高水平的 MPF 有关。激活刺激使得卵母细胞内游离的 Ca²⁺ 水平提高, 继而引起细胞内 cyclin B 的减少, 导致 MPF 水平下降或消失, 引起卵子激活。乙醇、电脉冲和氯化锶均可引起胞内 Ca²⁺ 的升高。单次电脉冲或乙醇刺激只能引起 Ca²⁺ 的单次波动(Ca²⁺ oscillations)^[14], 而 Sr²⁺ 作用则能引起多次 Ca²⁺ 波动^[13]。CHX 是一种蛋白质合成抑制剂, 通过作用 80S 的核糖体抑制肽链的移动, 从而抑制蛋白质的合成。乙醇、电脉冲或氯化锶与 CHX 对猪卵母细胞激活的协同促进作用机制, 可能是由于乙醇、电脉冲和氯化锶的刺激已经导致卵母细胞的激活, 而随后的 CHX 培养又进一步抑制了新的相关蛋白质(如 cyclin B) 的合成, 使 MPF 一直处于低水平, 进一步促进了卵母细胞的激活。单独的 CHX 不能使猪 IVM 卵母细胞激活的机制不清楚, 可能是猪卵母细胞对 CHX 不敏感, 只有与其他刺激因素联合使用时, 才起到协同促进的作用。这也说明, CHX 引起的卵母细胞激活不是通过 Ca²⁺ 波动起作用的, 而是通过抑制有关蛋白质的合成起作用的。

参考文献:

- [1] 谭景和, 周 琪, 杨婵云, 等. 卵龄和脉冲持续时间对小鼠卵母细胞电活化效果的影响[J]. 动物学报, 1995, 41(3): 327~331.
- [2] Tateno H, Kamiguchi Y. Parthenogenetic activation of Chinese hamster oocytes by chemical stimuli and its cytogenetic evaluation [J]. Mol Reprod Dev, 1997, 47: 72~78.

- [3] Presicce G A, Yang X. Parthenogenetic development of bovine oocytes matured *in vitro* for 24h and activated by ethanol and cycloheximide [J]. *Mol Reprod Dev*, 1994, 38: 380~ 385.
- [4] Prochazka R, Kanka J, Sutovsky P, Fulka J, Motlik J. Development of pronuclei in pig oocytes activated by a single electric pulse [J]. *J Reprod Fertil*, 1992, 96: 725~ 734.
- [5] Nussbaum D J, Prather R S. Differential effects of protein synthesis inhibitors on porcine oocyte activation [J]. *Mol Reprod Dev*, 1995, 41: 70~ 75.
- [6] 秦鹏春, 谭景和, 吴光明, 等. 猪卵巢卵母细胞体外成熟与体外受精的研究[J]. *中国农业科学*, 1995, 28: 58~ 66.
- [7] 李光鹏, 魏 鹏, 孟庆刚, 孙兴参, 谭景和. 应用氯化铯和放线菌酮对小鼠卵母细胞进行孤雌激活的研究[J]. *细胞生物学杂志*, 1998, 20(2): 92~ 95.
- [8] Didion B A, Martin M J, Markert C L. Parthenogenetic activation of mouse and pig oocytes matured *in vitro* [J]. *Theriogenology*, 1990, 33: 1165~ 1175.
- [9] Petr J, Grocholova R, Rozinek J, Jilek F. Activation of *in vitro* matured pig oocytes by combined treatment of ethanol and cycloheximide [J]. *Theriogenology*, 1996, 45: 1473~ 1478.
- [10] Yang X, Presicce G A, Moraghan L, Jing S, Foote R H. Synergistic effect of ethanol and cycloheximide on activation of freshly matured bovine oocytes [J]. *Theriogenology*, 1994, 41: 395~ 403.
- [11] First N L, Leibfried Rutledge M L, Northey D L, Nuttleman P R. Use of *in vitro* matured oocytes 24h of age in bovine nuclear transfer [J]. *Theriogenology*, 1992, 37: 211(abstract).
- [12] O'Neil G T, Rolfe L R, Kaufman M H. Developmental potential and chromosome constitution of strontium-induced mouse parthenogenones [J]. *Mol Reprod Dev*, 1991, 30: 214~ 219.
- [13] Bos-Mikich A, Swann S, Whittingham D G. Calcium oscillations and protein synthesis inhibition synergistically activate mouse oocytes [J]. *Mol Reprod Dev*, 1995, 41: 84~ 90.
- [14] Cuthbertson K S R, Whittingham D G, Cobbold P H. Free calcium increases in exponential phases during mouse oocyte activation [J]. *Nature*, 1981, 294: 754~ 757.

ARTIFICIAL ACTIVATION OF PORCINE OOCYTES MATURED *IN VITRO*

LI Guang-peng, MENG Qing-gang, WEI Peng, LI Zr-yi, SUN Xing-shen, TAN Jing-he
(*Department of Bioengineering, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China*)

Abstract: This study was designed to evaluate the effects of cycloheximide (CHX), a protein synthesis inhibitor, on artificial activation of *in vitro*-matured (IVM) porcine oocytes with alcohol, electric pulse or strontium chloride (SrCl₂), respectively. The results showed that alcohol, electric pulse or SrCl₂ could activate the porcine oocytes which were cultured in modified TCM-199 media for 44-48 h. When the oocytes were primed with alcohol, electric pulse or SrCl₂ and then cultured in CHX-contained TCM-199 media for 20 h, the activation rates were significantly higher than that stimulated with alcohol, electric pulse or SrCl₂ alone. In conclusion, alcohol, electric pulse and strontium chloride acted synergistically with CHX in activating the porcine IVM oocytes.

Key words: Cycloheximide (CHX); Parthenogenetic activation; Oocytes; Porcine