

家兔胚胎细胞周期的调控

王永胜, 曾申明, 朱士恩, 田见晖, 李树静, 余文莉, 张忠诚, 陈永福

(中国农业大学动物科技学院胚胎生物技术实验室, 北京 100094)

摘要: 本实验用化学药物对家兔胚胎细胞周期进行调控, 以建立细胞周期同期化的方法。实验结果表明: (1) 用 1.00 $\mu\text{g/ml}$ 噻氨酯哒唑(nocodazole) 处理家兔 16 细胞胚胎 12 h, 可使胚胎细胞完全同期化于 M 期; (2) 细胞周期同期化于 M 期的家兔胚胎细胞用 0.20 $\mu\text{g/ml}$ 阿菲迪霉素(aphidicolin) 处理 8 h, 可完全抑制 DNA 的合成, 使胚胎细胞同期化于 G_1 期; (3) 细胞周期同期化于 M 期的家兔胚胎细胞在体外培养 8 h 后, 然后用 1.00 $\mu\text{g/ml}$ 环己酰胺(cycloheximide) 处理 8 h, 可使胚胎细胞同期化于 G_2 期。本研究的结果还表明细胞周期同期化处理不影响胚胎的体外发育, 但胚胎移植后的产仔率明显低于对照组($P < 0.05$)。

关键词: 细胞周期; 调控; 胚胎; 家兔

中图分类号: S829.1; S814.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 0366-6964(2001)06-0517-08

供体细胞核和受体卵母细胞细胞质周期的一致性与核移植胚胎的发育潜力密切相关^[1]。但是, 哺乳动物早期胚胎卵裂球分裂不同步, 且随着胚胎发育的升高, 这种现象越来越明显^[2]。早期胚胎细胞周期特点是: S 期较长且时间相对恒定, 占整个细胞周期的绝大部分时间, G_1 期缺乏或很短, G_2 期变化较大^[3]。用未经同期化处理的卵裂球为核供体进行核移植时, 由于供体核大多处于 S 期, 而受体细胞质处 M 期, 这可能是造成核移植胚胎发育能力低的原因之一^[4]。为提高胚胎细胞核移植的效率, 深入研究核质互作机理, 加强细胞周期调控方法的研究尤为必要。目前, 防止细胞分裂并使之处于 M 期的常用药物有 2 种, 即秋水酰胺(colcemid) 和噻氨酯哒唑。由于噻氨酯哒唑的毒性比秋水酰胺小, 它已广泛用于牛^[5] 和小鼠^[6] 等胚胎细胞周期的调控。由于早期胚胎 G_1 期缺乏或很短, 因此只有在 M 期恢复时, 用抑制 DNA 合成的药物, 使胚胎细胞分裂停止在 G_1/S 转折期, 才可获得 G_1 期卵裂球。常用的 DNA 合成抑制剂是阿菲迪霉素。常用的 G_2 期同期化药物是环己酰胺。牛 8-细胞胚胎在含 5 $\mu\text{g/ml}$ 环己酰胺的培养液中培养 12 h, 可使胚胎细胞处于 G_2 期, 但对 DNA 合成无不利影响^[7]。本实验将运用噻氨酯哒唑、阿菲迪霉素和环己酰胺对家兔胚胎细胞周期进行调控, 并研究去阻断后胚胎的体内、外发育状况。

1 材料和方法

1.1 实验动物 母兔为性成熟的新西兰白兔或青紫兰兔, 6 月龄以上, 体重在 3.5 kg 左右, 公兔为 10 月龄以上, 体重为 6~8 kg 的新西兰白兔(北京农业大学种兔场)。家兔饲养在自然光照条件下, 自由饮食。

收稿日期: 2000-06-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目

作者简介: 王永胜(1965-), 男, 内蒙人, 博士, 主要从事兽药开发与应用。

1.2 胚胎培养 胚胎培养液为 M199(GIBCO) + 10% FBS(中国医学科学院血液学研究所) + 1.25 mmol/L 丙酮酸钠(GIBCO) + 0.1 mmol/L EDTA(Sigma) + 双抗(华北制药厂), 简称 RM199。培养皿为 10 mm × 35 mm 的一次性塑料培养皿(Nunc)。胚胎培养在 50 μ l 的小滴中, 上盖矿物油(Sigma), 每个小滴中放入 10 枚胚胎, 每 48 h 更换一半培养液。培养条件为 38 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 的空气和 100% 湿度。

1.3 胚胎来源 供体母兔连续 6 次颈部皮下注射促卵泡素(FSH, 中国科学院动物所生产), 每次每只用量 0.15 mg, 相邻两次间隔 12 h, 最后一次 FSH 注射后 12 h, 每只母兔耳缘静脉注射人绒毛膜促性腺激素(hCG, 上海生物化学制药厂) 100 IU, 随即与公兔交配。交配后 48 h, 放血处死, 在无菌条件下, 用 mPBS^[8] 冲取 1-6 细胞阶段的胚胎。

1.4 胚胎细胞周期同期化 M 期同期化: 家兔 16 细胞阶段的胚胎用不同浓度(0.05 μ g/ml, 0.10 μ g/ml, 0.50 μ g/ml, 1.00 μ g/ml 和 2.00 μ g/ml) 噻氨酯啶唑的 RM199 充分洗涤后, 移入相应浓度噻氨酯啶唑的 RM199 小滴中继续培养 16 h 后, 测定胚胎细胞的 DNA 含量, 确定使胚胎细胞完全处于 M 期的最低噻氨酯啶唑浓度, 再确定最短处理时间。胚胎用此条件处理后, 再移入 RM199 小滴中培养, 观察其发育状况, 并与未经处理的胚胎进行对照。

G₁ 期同期化: 将同期化于 M 期的胚胎(胚胎细胞停止在分裂中期, 外观上仍为 16 细胞阶段) 移入含不同浓度(0.05 μ g/ml, 0.10 μ g/ml, 0.20 μ g/ml, 0.50 μ g/ml 和 1.00 μ g/ml) 阿菲迪霉素的 RM199 小滴培养 8 h 后, 测定胚胎细胞的 DNA 含量, 确定完全阻断 DNA 合成的最低浓度。

G₂ 期同步化: 将同期化于 M 期的胚胎(胚胎细胞停止在分裂中期, 外观上仍为 16 细胞阶段) 移入 RM199 中继续培养 8 h, 然后, 将已分裂为 32 细胞阶段的胚胎移入不同浓度(0.10 μ g/ml, 0.50 μ g/ml, 1.00 μ g/ml, 2.00 μ g/ml 和 5.00 μ g/ml) 环己酰胺的 RM199 小滴, 继续培养 8 h 后, 进行胚胎细胞 DNA 含量测定, 确定 G₂ 期同步化的最低环己酰胺浓度。

1.5 胚胎细胞核 DNA 含量的测定 胚胎在含 0.5% 链霉蛋白酶的 mPBS 中(38 $^{\circ}$ C) 消化约 10 min, 待粘蛋白层完全去除和透明带部分消化后, 移入无 Ca²⁺、Mg²⁺ 的 mPBS 中洗涤并温育约 10 min, 在 mPBS 中用细管轻轻吹打, 分离成单个卵裂球。然后将单个卵裂球置于洁净的载玻片上, 待干燥后, 移入新配制的乙醇: 冰乙酸(3:1) 中固定 5 min, 再移入乙醇: 冰乙酸: 福尔马林(8.5:0.5:1) 中固定 1 h, 空气干燥后, 贮存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱内。固定处理的胚胎卵裂球按 Bolton 等^[9] 所描述的方法进行 Feulgen 染色, 经加拿大胶封固后, 用扫描显微分光光度计(Univar, ReichertJung) 在 560 nm 波长处, 测量单个细胞核积分光密度值(I. O. D.), 并与精子(单倍体) I. O. D. 值相比较来确定胚胎细胞核 DNA 的相对含量。

1.6 囊胚细胞计数 囊胚细胞计数按 Ebert 等^[10] 的方法, 将胚胎移入含 10 μ g/ml Hoechst33342(Sigma) 的 DPBS 中, 在 38 $^{\circ}$ C 培养箱温育 20 min 后, 连同少量 DPBS(约 10 μ l) 置于洁净载玻片上, 用两边涂有少量凡士林的石英盖玻片覆盖。在荧光显微镜(Olympus) 下, 用 U 激发, L435 nm 阻挡滤光片, 计算每个胚胎的细胞数。

1.7 胚胎移植 经细胞周期同期化处理的胚胎, 在体外培养发育到致密桑椹胚, 移入假妊娠约 3 d 的受体输卵管中, 每侧输卵管移入 6~8 枚胚胎。

1.8 实验数据统计分析 百分数之间的比较采用卡方(χ^2) 检验, 平均数之间的比较采用 t 检验。

2 结果与分析

2.1 噻氨酯哒唑对家兔胚胎细胞周期的同期化作用

单个精子 DNA 的平均 I. O. D. 值为 4215.62。家兔 16 细胞胚胎在含相应浓度噻氨酯哒唑的 RM 199 培养液中培养 16 h 后, 测定卵裂球 DNA 的 I. O. D. 值, 并以单个精子 DNA 的 I. O. D. 值作对照, 确定 DNA 的相对含量。DNA 相对含量是精子 4 倍的卵裂球确定为 M 期卵裂球, 结果见表 1。

表 1 不同浓度噻氨酯哒唑对家兔胚胎卵裂球 M 期同期化的效果

Table 1 Effect of different concentrations of nocodazole on the proportion of rabbit blastomeres arrested in metaphase

浓度($\mu\text{g}/\text{ml}$) Concentration	所用胚胎数 No. embryos	卵裂球数 No. blastomeres	M 期卵裂球数(%) No. blastomeres in M
0.00	10	315	20(6.3)
0.05	10	300	31(10.3)
0.10	10	243	49(20.2)
0.50	10	198	108(54.5)
1.00	10	159	158(99.4)
2.00	10	158	158(100.0)

表 1 的结果表明使家兔 16 细胞胚胎卵裂球完全处于 M 期的最低噻氨酯哒唑浓度为 1.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。家兔 16 细胞胚胎在含 1.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 噻氨酯哒唑的 RM 199 中培养 0.4、0.8、1.2、1.6 h 后, 处于 M 期卵裂球数见表 2。

表 2 噻氨酯哒唑的处理时间对家兔胚胎卵裂球 M 期同期化的影响

Table 2 Effect of exposure time of nocodazole on the proportion of rabbit blastomeres arrested in metaphase

培养时间(h) Exposure time	所用胚胎数 No. embryos	卵裂球数 No. blastomeres	M 期卵裂球数(%) No. blastomeres in M
0	10	159	9(5.7)
4	10	158	70(44.3)
8	10	159	141(88.7)
12	10	159	158(99.4)
16	10	159	158(99.4)

由表 2 的结果可见, 胚胎在含 1.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 噻氨酯哒唑的 RM 199 中培养 12 h 可使卵裂球完全处于 M 期。

家兔 16 细胞胚胎在含 1.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 噻氨酯哒唑的 RM 199 中培养 12 h, 移入 RM 199 小滴中继续培养, 在 1 h 之内胚胎分裂为 32 细胞。去除噻氨酯哒唑后, 每隔 1 或 2 h 取 2-3 枚胚胎的 20 个以上卵裂球, 测定其 DNA 的 I. O. D. 值。图 1 为去除噻氨酯哒唑阻断后卵裂球 DNA I. O. D. 值的变化曲线。由图 1 可见, 去除噻氨酯哒唑阻断后 2 h, DNA 含量开始升高, 持续到 8 h 开始下降, 13 h 后 DNA 含量下降至 1-2 h 的水平。这说明去除噻氨酯哒唑阻断后, 胚胎即恢复分裂并进入 32 细胞期的细胞周期, 该细胞周期约持续 12 h, 其中 G_1 期很短(1 h 之内) S

期约 7-8 h, G₂/M 期约 3-4 h。

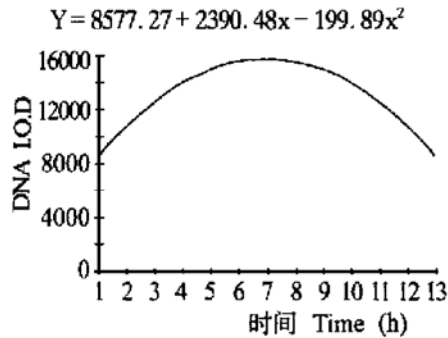


图 1 去除塞胺酯吡唑后家兔胚胎细胞 DNA 相对含量的变化规律

Fig. 1 The graph of DNA relative content in rabbit blastomeres after removing nocodazole

2.2 阿菲迪霉素对家兔胚胎细胞周期的阻断作用

家兔 16-细胞胚胎在含 1.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 噻氨酯吡唑的 RM199 中培养 12 h 后, 移入不同浓度 (0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 1.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 阿菲迪霉素的 RM199 小滴中继续培养 8 h 后, 进行胚胎细胞 DNA 相对含量的测定。阿菲迪霉素对同期化于 M 期胚胎细胞 DNA 合成的阻断效果见表 3。

表 3 不同浓度阿菲迪霉素对胚胎细胞 DNA 合成的阻断效果

Table 3 Effects of different concentrations of aphidicolin on DNA synthesis of rabbit embryonic cells

浓度($\mu\text{g}/\text{ml}$) Concentration	胚胎数 No. embryos	卵裂球数 No. blastomeres	G1 期卵裂球数(%) No. blastomeres in G1
0.00	5	160	0(0.0)
0.05	5	159	11(6.9)
0.10	5	160	119(74.4)
0.20	5	160	159(99.4)
0.50	5	159	158(99.4)
1.00	5	158	158(100.0)

表 3 的结果表明胚胎在 0.10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 阿菲迪霉素的 RM199 中培养 8 h 后, 74.4% 卵裂球的 DNA 合成被阻断, 0.20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 阿菲迪霉素可使胚胎卵裂球 DNA 的合成被完全阻断。

去除阿菲迪霉素后, 每隔 1 或 2 h 取 2-3 枚胚胎的 20 个以上卵裂球, 测定 DNA 的 I. O. D. 值。图 2 为去除阿菲迪霉素后卵裂球 DNA I. O. D. 值的变化曲线。由图 2 可见, 去除阿菲迪霉素阻断后 1 h, DNA 含量显著增高, 且一直持续到 7-8 h 才开始下降, 12 h DNA 含量下降至 0-1 h 水平。说明去除阿菲迪霉素阻断后, 胚胎即恢复 32-细胞期的细胞周期, 该细胞周期约持续 12 h。

2.3 环己酰胺对家兔胚胎细胞周期的阻断作用

家兔 16-细胞胚胎在含 1.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 噻氨酯吡唑的 RM199 培养液中培养 12 h 后, 用 RM199 充分洗涤并继续培养 8 h, 移入不同浓度 (0.10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、2.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 5.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 环己酰胺的 RM199 小滴中继续培养 8 h, 再进行胚胎卵裂球 DNA 相对含量的测定, 环己酰胺对同期化于 M 期胚胎细胞细胞周期的阻断效果见表 4。由表 4 可见, 同步化于 M 期并发育至晚 S 期的胚胎在 1.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 环己酰胺的 RM199 中培养 8 h 后, 约

98.8% 卵裂球的处于 G₂ 期。去除环己酰胺阻断后,在 RM199 中培养 1-2h,胚胎进入 M 期并开始分裂。

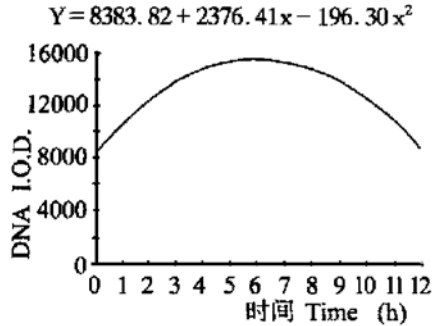


图2 去除阿菲迪霉素后家兔胚胎 DNA 合成变化的曲线

Fig. 2 The graph of DNA content in rabbit blastomeres after removing aphidicolin

2.4 细胞周期同期化处理对家兔胚胎发育的影响

2.4.1 细胞周期同期化处理对家兔胚胎体外发育的影响:家兔 16-细胞胚胎经细胞周期同步化处理后,其体外发育情况见表 5。处理 1 为胚胎在 1.00 μg/ml 噻氨酯哒唑的 RM199 中培养 12 h 后,移入 RM199 中继续培养;处理 2 为胚胎先后在 1.00 μg/ml 噻氨酯哒唑的 RM199 中培养 12 h 和 0.20 μg/ml 阿菲迪霉素的 RM199 中培养 8 h 后,移入 RM199 中继续培养;处理 3 为胚胎先在 1.00 μg/ml 噻氨酯哒唑的 RM199 中培养 12 h,然后在 RM199 中培养 8 h,再于 1.00 μg/ml 环己酰胺的 RM199 中培养 8 h,最后移入 RM199 中继续培养;对照组是未经任何处理的 16-细胞胚胎。由表 5 可见,家兔 16-细胞胚胎经细胞周期同步化处理后,囊胚和孵化囊胚发育率及囊胚细胞数与对照组,无显著差异($P > 0.05$)。

表 4 不同浓度环己酰胺对家兔胚胎细胞周期的阻断结果
Table 4 Effects of different cocentrations of cycloheximide on mitosis of rabbit embryonic cells

浓度(μg/ml) Concentration	所用胚胎数 No. embryos	卵裂球数 No. blastomeres	DNA 含量为 4C 期卵裂球数(%) No. blastomeres in G ₂
0.00	5	305	0(0.0)
0.10	5	289	26(9.0)
0.50	5	202	129(63.9)
1.00	5	160	159(98.8)
2.00	5	159	158(99.4)
5.00	5	158	158(100.0)

2.4.2 细胞周期同期化处理对家兔胚胎体内发育的影响:家兔 16-细胞胚胎经 M, G₁ 和 G₂ 同期化处理后,在体外培养发育到致密桑椹胚后,移入假孕受体内的发育情况见表 6。由表 6 可见,家兔 16-细胞胚胎经细胞周期同步化处理后,移植于假孕受体可发育产仔,且妊娠率与对照组无显著差异($P > 0.05$),但产仔率显著低于对照组($P < 0.05$)。在 3 种处理方法中,阿菲迪霉素和环己酰胺对产仔率的影响最大,这 2 组的产仔率显著低于噻氨酯哒唑组($P < 0.05$)。

表5 细胞周期同期化处理对家兔胚胎体外发育的影响

Table 5 Effect of cell cycle synchronization treatment on development of rabbit embryos *in vitro*

处理 Treatment	胚胎数 No. embryos	囊胚数(%) No. blastocysts	孵囊胚数(%) No. hatched blastocysts	囊胚细胞(X±SE) Cell number of blastocyst
1	44	42(95.5) ^a	38(86.4) ^b	120.37±2.50 ^c
2	34	32(94.1) ^a	24(70.6) ^b	120.37±2.83 ^c
3	36	34(94.4) ^a	25(69.4) ^b	119.87±1.86 ^c
对照 Control	37	36(97.3) ^a	32(86.5) ^b	121.12±3.56 ^c

a-c 同一栏数值上标字母相同示差异不显著($P > 0.05$)。a-c Values with the same superscripts in the same column show no significant difference($P > 0.05$) .

1. The embryos were cultured in RM 199 containing 1.00 µg/ml nocodazole for 12 h followed by in RM 199. 2. The embryos were cultured in 1.00 µg/ml nocodazole for 12 h and 0.20 µg/ml aphidicolin for 8 h respectively followed by in M 199. 3. The embryos were first cultured in 1.00 µg/ml nocodazole for 12h, RM 199 for 18 h and 1.00 µg/ml cycloheximide for 18h respectively, then transferred into RM 199. Control: The 16-cell embryos were cultured in RM 199.

表6 细胞周期同步化处理对家兔胚胎体内发育的影响

Table 6 Effect of cell cycle synchronization treatment on development of rabbit embryos *in vivo*

处理 Treatment	移植胚胎数 No. embryos	受体数 No. recipients	妊娠数(%) No. pregnancies	产仔数(%) No. live pups
1	120	10	8(80.0) ^a	30(25.0) ^b
2	141	11	8(72.7) ^a	20(14.2) ^c
3	144	12	8(66.7) ^a	16(11.1) ^c
对照 Control	141	11	9(81.8) ^a	54(38.3) ^d

a-d 同一栏数值上标字母不同示差异显著($P < 0.05$)。a-d Values with different superscripts in the same column show significant difference($P < 0.05$) .

3 讨论

噻氨酯啉可干扰微管蛋白聚合^[11],阻止纺锤体的形成,从而使细胞停留在M期^[12]。但其作用是可逆的,除去药物后,纺锤体可重新形成,细胞恢复有丝分裂^[13]。本实验研究了噻氨酯啉对家兔胚胎细胞M期的同期化效果。结果表明噻氨酯啉对家兔16-细胞期胚胎分裂的阻断作用具浓度、时间依赖性,噻氨酯啉完全使家兔16-细胞胚胎的卵裂球处于M期的最低浓度为1.00 µg/ml,最短时间为12 h,这与其对小鼠胚胎细胞周期的调控作用相似^[14]。去除噻氨酯啉后,家兔胚胎细胞立即恢复分裂并进入32-细胞期的细胞周期。通过对卵裂球DNA相对含量的测定表明该细胞周期约持续12 h。

阿菲迪霉素与DNA聚合酶α结合,抑制胚胎细胞DNA的合成,使之处于G₁期^[15]。本实验的结果表明阿菲迪霉素对家兔胚胎细胞DNA合成的阻断作用呈浓度效应型。胚胎在含0.10 µg/ml阿菲迪霉素的RM 199培养液中培养8 h后,大部分卵裂球的DNA合成被阻断,而在0.20 µg/ml阿菲迪霉素中培养相同时间,卵裂球DNA的合成被完全阻断,处于G₁期,这与Collas等^[1]报道的结果一致。去除阿菲迪霉素阻断1 h后,胚胎细胞DNA的含量显著增高,一

直持续到 7~ 8 h 才开始下降。12 h 后 DNA 含量下降至 0~ 1 h 的水平, 整个周期约持续 12 h。这与去除噻氨酯哒唑阻断后的结果一致, 说明胚胎经阿菲迪霉素同步化处理后, 正常细胞周期不受影响。

环己酰胺是一种蛋白质合成抑制剂, 主要阻止蛋白质合成过程中肽链的延长^[16]。细胞培养液中加入一定量的环己酰胺可阻止细胞进入分裂期, 停止于 G₂ 期^[17]。本实验用环己酰胺对家兔胚胎细胞周期进行调控, 研究表明家兔胚胎在 1.00 μg/ml 环己酰胺的 RM 199 中培养 8 h, 98.8% 卵裂球处于 G₂ 期。去除环己酰胺后 1~ 2 h, 胚胎细胞进入分裂期。这与用环己酰胺处理牛 8-细胞胚胎的结果基本一致^[7]。

本实验还研究了细胞周期同期化处理对家兔胚胎体内、外发育的影响。结果表明家兔胚胎经 M、G₁ 和 G₂ 期同期化处理, 尽管胚胎的体外发育与对照组相比未出现明显差异, 但对胚胎移植后的产仔率产生明显的副作用。这说明哺乳动物早期胚胎细胞周期的不一致性, 可能对胚胎在母体子宫中的附植及后期胎儿的发育非常重要。导致这一结果的原因本研究的结果难以解释, 还有待于深入研究。

参考文献:

- [1] Collas P, Balise J, Robl J M. Influence of cell cycle stage of the donor nucleus on development of nuclear transplantation rabbit embryos[J]. Biol Reprod, 1992, 46: 492~ 450.
- [2] Kelly S T, Mulnard JG, Graham C F. Cell division and cell allocation in early mouse development[J]. J Embryol Exp Morphol, 1978, 48: 37~ 51.
- [3] Chisholm J C. Analysis of the fifth cell cycle of mouse development[J]. J Reprod Fertil, 1988, 84: 29~ 36.
- [4] Yang X, Anderson G B. Micromanipulation of mammalian embryos: principles, progress and future possibilities [J]. Theriogenology, 1992, 38: 315~ 335.
- [5] Techakumphu M, Adenot P, Chense P, Rao V H, Heyman Y and Rechar J P. Viability of bovine blastomeres after metaphase arrest with nocodazole[J]. Theriogenology, 1993, 39: 328.
- [6] Kato Y, Tsunoda Y. Synchronous division of mouse two-cell embryos with nocodazole *in vitro*[J]. J Reprod Fertil, 1992, 95: 39~ 43.
- [7] Campbell K H S, Richie W A, Wilmot I. Nuclear-cytoplasmic interactions during the first cell cycle of nuclear reconstructed bovine embryos: implication for deoxyribonucleic acid replication and development[J]. Biol Reprod, 1993, 49: 933~ 942.
- [8] Whittingham D G. Survival of mouse embryos after freezing and thawing[J]. Nature, 1971, 233: 125~ 126.
- [9] Boiton V N, Oades P J, Johnson MH. The relationship between cleavage, DNA replication and gene expression in the 2-cell mouse embryos[J]. J Embryol Exp Morph, 1984, 79: 139~ 163.
- [10] Ebert K M, Hammer R E, Papaioannou V E. A simple method for counting nuclei in the preimplantation mouse embryos[J]. Experimentia, 1985, 41: 1207~ 1209.
- [11] Hoebeke J, Van Nijen G, De Brabandder M. Interaction of nocodazole(R17934), a new antitumoral drug, with rat brain tubulin[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1976, 69: 319~ 324.
- [12] Johnson M H, Pickering S J, Dhiman A, Radcliffe G S, Maro B. Cytocortical organization during natural and prolonged mitosis of mouse 8-cell blastomeres[J]. Development, 1988, 102: 143~ 158.
- [13] Maro B, Bornens M. The centriole-nucleus association: effects of cytochalasin B and nocodazole[J]. Bio Cell, 1980, 39: 287~ 290.
- [14] Samake S, Smith L C. Effects of cell-cycle arrest agents on cleavage and development of mouse embryos[J].

- J Exp Zool, 1996, 274: 111~ 120.
- [15] Satoh N, Ikegami S. A definite number of aphidicolin-sensitive cell cycle events are required for acetylcholinesterase development in the presumptive muscle cells of the ascidian embryos[J]. J Embryol Exp Morphol, 1981, 61: 1~ 13.
- [16] Ekholm C, Magnusson C. Rat oocytes maturation: effects of protein synthesis inhibitors[J]. Biol Reprod, 1979, 21: 1287~ 1293.
- [17] Hunter A D, Moor R M. Stage dependent effects of inhibiting RNA and protein synthesis on meiotic maturation of bovine oocytes *in vitro*[J]. J Dairy Sci, 1987, 70: 1646~ 1651.

THE CONTROL OF RABBIT EMBRYONIC CELL CYCLE

WANG Yong-sheng, ZENG Sheng-ming, ZHU Shi-en, TIAN Jian-hui, LI Shu-jing,
YU Wen-li, ZHANG Zhong-cheng, CHEN Yong-fu
(*Lab of Animal Embryonic Biotechnology, College of Animal
Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100094, China*)

Abstract: The objective of this experiment was to control the rabbit embryonic cell cycle with chemicals to give programs for the cycle synchronization. The DNA contents of blastomeres were analyzed by scanning microspectrophotometric assay following Feulgen staining reaction. The reliable methods for synchronizing cell cycle at M, G₁ and G₂ phase were given in the followings. When the early 16-cell stage rabbit embryos were cultured in M199 supplemented with 1.00 μg/ml nocodazole for 12 h, the blastomeres were all synchronized at M phase. When the embryos which cells arrested at M phase were cultured in M199 containing 0.20 μg/ml aphidicolin for 8h, the embryos were divided into 32-cell, but they did not synthesized DNA and were arrested at G₁ phase. The embryonic cells were arrested at G₂ phase after the embryos were first cultured in 1.0 μg/ml nocodazole for 12h, then in M199 for 8h and finally in 1.00 μg/ml cycloheximide for 8h. The developmental abilities of embryos synchronized at special cell cycle stage were not be effected when they were cultured in M199 *in vitro*, but rates of living pups were significantly lower than the control after the synchronized embryos were transferred into recipients ($P < 0.05$).

Key words: Cell cycle; Control; Embryo; Rabbit