

猪卵母细胞孤雌激活的研究

李月涛¹, 冯广鹏², 魏红江¹, 曾养志^{1*}

(1. 云南农业大学动物科学技术学院, 云南昆明 650201; 2. 郑州牧业工程高等专科学校畜牧工程系, 河南郑州 450011)

摘要 从卵母细胞孤雌激活的机制及影响因素, 猪卵母细胞的激活, 猪孤雌胚死亡主要原因, 提高卵母细胞孤雌激活效果的技术途径, 以及对孤雌激活的研究意义和发展前景等方面, 对猪卵母细胞孤雌激活研究进行了综述。

关键词 猪; 卵母细胞; 孤雌激活

中图分类号 S828.3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)08-02289-02

Study on Parthenogenetic Activation of Porcine Oocyte

LI Yue-tao et al (College of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Yunnan, Kunming 650201)

Abstract Research progress of parthenogenesis activation of porcine oocyte was reviewed in this paper from the aspects of parthenogenetic activation mechanism of porcine oocyte, its influencing factors, activation of porcine oocyte, technology of improving activation effect as well as the research prospect of parthenogenetic activation.

Key words Pig; Oocyte; Parthenogenetic activation

孤雌生殖 (parthenogenesis) 一词最早由 Ower^[1] (1849) 提出, 是指有性生殖的动物卵子不经过精子的受精作用而被激活, 并开始胚胎发育的无性生殖过程。一般来说, 胚胎正常生长需要雄性 DNA, 因为某些基因只有从父亲那里继承过来, 才能被激活, 并发挥它们应有的功能。而孤雌生殖的个体直接来自卵子, 遗传物质与卵子一致。自然界中, 孤雌生殖现象在无脊椎动物和低等脊椎动物中较常见, 哺乳动物卵自发激活 (Spontaneous Activation) 生成畸胎瘤的现象时有发生。20 世纪 80 年代以来, 研究不断深入, 尤其是进入 90 年代, 随着哺乳动物细胞核移植研究的开展, 卵母细胞的孤雌激活得以较为系统的研究, 在研究动物、家畜及人卵母细胞激活方面均取得较大进展^[2]。

1 卵母细胞孤雌激活的机制

受精时, 卵子的激活与成熟促进因子 (MPF) 的失活是由一系列的细胞内 Ca^{2+} 多次持续波动引起的^[3]。精子激活卵母细胞的机制有 2 个主要假说。其一是精子与卵母细胞外膜上的受体结合, 作用于 G 蛋白, 刺激磷酸肌醇途径而激活卵; 其二是精子内的因子通过精子与卵母细胞接触而释放到卵母细胞质中, 这种因子与细胞质或细胞内膜相互作用, 刺激磷酸肌醇系统而使卵母细胞激活^[4]。卵母细胞激活过程中, 细胞内 Ca^{2+} 节律性脉冲的升高起关键介导作用^[5], Ca^{2+} 波动是启动卵母细胞周期和继续发育的前提, 直接注射 Ca^{2+} 或用 Ca^{2+} 载体 A23187、乙醇、电刺激、 Sr^{+} 刺激均能引起卵母细胞质内 Ca^{2+} 多次波动性升高。卵母细胞内 Ca^{2+} 升高产生膜的超极化反应, 皮质颗粒释放至卵周隙导致染色体解聚, 启动减数分裂排出第二极体, 促进原核形成、卵裂和早期胚胎发育。

卵母细胞 MII 期的维持与高水平的成熟促进因子 (MPF) 活性有关^[6]。MPF 的活性是由对 Ca^{2+} 非常敏感的细胞静止因子 (CSF) 来维持的。MII 期卵母细胞受精激活卵内 Ca^{2+} 升高, 破坏已存在的 CSF, 导致 MPF 活性降低。亚胺环己酮 (CHX) 是一种蛋白质合成抑制剂, 可以使小鼠和牛的

卵母细胞孤雌活化, 但不能使猪和中国仓鼠卵母细胞活化。CHX 与其他因素协同促进卵母细胞活化的作用机制: 乙醇、电脉冲和氯化铯的刺激导致卵母细胞的活化, CHX 进一步抑制卵内新生的相关蛋白质合成, 使之不能产生新的 CSF 和 MPF, 使 MPF 一直处于低水平状态, 进一步促进了卵母细胞的活化。CHX 引起的卵母细胞活化不是通过 Ca^{2+} 波动起作用, 而是通过抑制有关蛋白质合成起作用。

2 猪卵母细胞的激活

单独使用乙醇对猪 IVM 卵母细胞进行激活效果较差, 电脉冲对猪卵母细胞的激活作用明显。场强 130 V/mm、脉冲 40~120 us 激活时囊胚发育率较高; 场强 130 V/mm、脉冲 80 us 的处理囊胚发育率最高, 可达 20.12%^[7]。根据 Machaty 等的报道, 对猪卵母细胞进行 200 μ mol/L Thimerosal 处理 10 min + 8 mmol/L DTT 30 min, 效果也较好, 孤雌激活率达 74%, 桑椹胚+囊胚发育率达 42%^[8]。 Ca^{2+} 载体 A23187 对猪卵母细胞具有良好的激活作用, Ca^{2+} 载体 A23187 (25 μ mol/L)、CHX (10 μ g/ml) 联合激活猪卵母细胞可获得 85% 的激活率^[9]。往体外成熟猪卵母细胞中注射 0.1 mmol/L 的 $CaCl_2$, 可使 75% 的卵发生皮质反应, 79.4% 形成 1 个或多个原核, 有 14.7% 的激活卵发育到桑椹胚和囊胚, 部分发生孵化^[10]。单独使用 CHX, 浓度从 5~100 μ g/ml 均未能使猪 IVM 卵激活。但乙醇与 CHX 结合使用, 对猪 IVM 卵母细胞的激活具有协同作用, 激活率为 27.8%, 显著高于单独使用乙醇处理 (6.7%)^[10]。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%)。因此, 说明 CHX 与乙醇或电脉冲具有协同促进猪 IVM 卵母细胞激活的作用。

3 猪孤雌胚死亡的主要原因

在大量的孤雌发育研究中, 只有少数孤雌胚可以在附植后发育。孤雌胚的死亡不只局限在某一特定阶段, 它分布于从第 1 次卵裂开始到附植早期阶段的各个时期。目前有 2 个假说说明孤雌胚附植后发育失败的原因: 其一是激活卵细胞质功能缺陷; 其二是激活卵细胞核功能缺陷。支持细胞质功能缺陷的证据主要有 2 点。第 1 点证据: Hoppe 等报道, 杂合的雌核胚和杂合的雄核胚可完成附植后的发育过程, 并且试验得到了由雌核胚和雄核胚发育而成的小鼠个

基金项目 国家自然科学基金重点资助项目 (39830190)。

作者简介 李月涛 (1979-), 男, 河南新乡人, 硕士研究生, 研究方向: 猪体细胞克隆。* 通讯作者。

收稿日期 2006-12-17

体。但在随后的发育中死亡, Hoppe 的结果可能是由于去核不完全造成的。第 2 点证据: Hoppe 将孤雌囊胚内细胞团细胞的细胞核移入去核受精卵得到正常后代, 然而所有试图重复这个结果的试验均失败。试验结果证明: 雄原核移入单倍体孤雌胚可得到正常后代, 而含有 2 个雌原核的胚胎只能发生有限的发育。将雌、雄原核一起移入去核孤雌激活卵得到正常后代; 而将孤雌胚 2 个原核移入去核受精卵则不能发育至附植后阶段。此外, 研究还发现, 虽然在受精过程中, 精子细胞质成分也能进入卵子, 并与卵子细胞质相结合, 但受精后不久, 精子这些成分如线粒体等发生退化, 在随后发育过程中不起作用。因而, 目前倾向认为孤雌胚死亡是由于孤雌核存在某种程度的功能缺陷。此外, 培养条件的剧烈改变也是影响猪卵母细胞孤雌激活效果的重要因素^[1]。

4 提高猪卵母细胞激活效果的途径

(1) 从动物屠宰场到实验室操作时间间隔应尽可能的短, 最好在动物屠宰后 1~2 h 操作。

(2) 在 37~38.5 °C 的生理盐水中保存猪卵巢, 尽可能快地运回实验室, 温度在 31~36 °C 时对卵母细胞的成熟没有显著影响^[2]。

(3) 挑选卵母细胞周围有 3 层以上卵丘细胞包裹且细胞质均匀的卵母细胞进行成熟培养。

(4) 卵母细胞成熟后挑选核成熟 (排出第一极体) 且细胞质均匀的卵母细胞进行激活处理。

(5) 选用效果较好的电激活方法。

(6) 维持恒定的体外培养体系。

5 猪卵母细胞孤雌激活的意义和发展

卵母细胞激活是研究哺乳动物受精机制及发育机理的有效方法。通过对猪卵母细胞激活的研究, 可以为提高猪的体细胞克隆效率, 大规模生产为人类所需要的转基因猪, 提供理论和技术支持。更重要的是猪被认为是最理想的异种器官源, 它的大部分器官的大小、形状, 以及血液的生理指标和功能与人类相似; 且猪的数量充足, 妊娠周期短, 产仔多, 容易饲养, 可以充分满足临床需要, 被医学界认为是人类器官移植的最佳提供者^[3]。

20 世纪 60 年代该领域的研究陷入了低潮时期。20 世纪 70 年代重新崛起, 大多数研究者均着眼于提高孤雌激活率和发育率方法学的研究 (范必勤等, 1994)。卵的激活方法有所发展, 如电刺激法、酶激活法等。20 世纪 80 年代以来的研究不断拓宽深入, 已研究孤雌激活发育和正常受精卵的生理学和形态学变化, 并开始在分子水平上研究激活和孤雌发育的机理, 取得了显著进展。进入 20 世纪 90 年代,

随着哺乳动物细胞核移植研究的开展, 卵母细胞孤雌激活的研究开始系统化, 在试验动物、家畜及人卵母细胞激活方面均有较大进展。哺乳动物卵母细胞的人工激活, 是细胞核移植和微注射受精技术的重要步骤, 同时也是研究卵激活启动以及受精和发育机理的重要手段。对阐明哺乳动物卵的激活、受精和发育机理, 解答这些重要的生命现象及技术的应用具有重要意义。2005 年 4 月 21 日日本东京农业大学科学家科诺与韩国科学家在《自然》杂志发表文章称, 已成功培育出了 2 只单性繁殖老鼠, 其中 1 只成活并繁育了后代。这项技术在基因工程方面是一项重大突破, 随着这些研究的不断深入和拓展, 可以预计, 人们能更广泛地利用孤雌卵母细胞的激活及孤雌胚的发育技术研究动物的个体发育、细胞分化, 并为核移植技术和克隆动物深入细致的研究奠定基础。经孤雌生殖而产生的单倍体和纯合双倍体细胞系在各种遗传学中都具有重要的价值, 利用孤雌卵母细胞的激活及孤雌胚发育技术, 建立生产孤雌哺乳动物品系, 为加速家畜育种进程提供依据。

参考文献

- [1] SWANN K, OZIL J P. Dynamics of the calcium signal that triggers mammalian egg activation[J]. *Int Rev Cytol*, 1994, 152: 182-222.
- [2] 徐清华, 兰旅涛, 韦启鹏. 哺乳动物孤雌生殖研究进展[J]. *江西农业大学学报*, 1997, 9(2): 60-64.
- [3] IGARSHI H. Aging-related changes in calcium oscillations in fertilized mouse oocytes[J]. *Molecular Reproduction Development*, 1997, 28: 70-73.
- [4] SAGATA N. Meiotic metaphase arrest in animal oocytes: Its mechanisms and biological significance[J]. *Cell Biology*, 1996, 6: 22-28.
- [5] SUN Q. Y. Map kinase activity is down-regulated by phorbol ester during mouse oocyte maturation and egg activation[D]. *Molecular Reproduction Development*, 1999, 52: 310-318.
- [6] MACHATY Z, WANG W H, DAY B N, et al. Complete activation of porcine oocytes induced by the sulfhydryl reagent, Thimerosal[D]. *Biology of Reproduction*, 1997, 57: 1123-1127.
- [7] JILEK F, HUTTELOVA R, PETR J, et al. Activation of pig oocytes using calcium ionophore: effect of protein synthesis inhibitor cycloheximide[J]. *Animal Reproduction Science*, 2000, 63: 101-111.
- [8] MACHATY Z, FUNAHASHI H, MAYES M A, et al. Effect of injecting calcium chloride into in vitro-matured porcine oocytes[J]. *Biol Reprod*, 1996, 54: 316-322.
- [9] 李光鹏, 孟庆刚, 魏鹏, 等. 胺环己酮对猪卵母细胞人工孤雌激活作用的研究[D]. *畜牧兽医学报*, 2001, 32(5): 416-420.
- [10] HOPPE P C, K III MENSE. Full term development after transplantation of parthenogenetic embryonic nuclei fertilized mouse eggs[J]. *Proc nat Acad Sci UAS*, 1988, 79: 1912-1916.
- [11] 魏凤, 杜挺媛, 付强, 等. 哺乳动物卵母细胞孤雌激活的研究[J]. *中国牛业科学*, 2006, 32(4): 46-48.
- [12] 蔡元, 张兆旺, 田见晖, 等. 保存卵巢生理盐水温度的下降对猪卵母细胞体外成熟的影响[J]. *现代畜牧兽医*, 2005, 7: 17-18.
- [13] 施新猷. *现代医学实验动物学*[M]. 北京: 人民军医出版社, 2000.