

热激损伤对牛孤雌激活胚胎后续发育的影响

徐薇, 唐爽, 吕志一, 苏锋, 华松, 张涌*

(西北农林科技大学生物工程研究所, 农业部家畜生殖内分泌与胚胎工程重点实验室, 杨凌 712100)

摘要: 为了研究早期胚胎核与胞质对热激的应激反应, 以及产生应激后二者之间的相互作用对胚胎体外发育、合子期激活基因的表达及胚胎细胞凋亡的影响。本研究将孤雌激活胚随机分为 2 组分别于 38.5 或 41 °C 培养 7 h; 随后将二者核进行置换, 使用正常培养的胚胎与热激胚胎进行核置换, 分别构建热激核-正常胞质重构胚以及热激胞质-正常核重构胚, 检测了核质置换胚胎的体外发育率、合子激活基因的表达和胚胎凋亡情况。结果, 当正常核移入 41 °C 热激的卵胞质, 重构胚的发育率显著下降; 热激后的核质置换胚胎中存在合子基因激活不完全的现象, 这种情况主要存在于热激胞质-正常核重构胚中; 热激能诱导胚胎发生细胞凋亡, 早期胚胎的胞质对热激更敏感, 并在后期的诱导凋亡中起到主导作用。这些结果表明, 虽然热激对核和胞质都有损伤, 但胞质对热激损伤更为敏感。早期胚胎受到热激后导致发育能力降低的易感性主要是由胞质所引起的; 早期胚胎受到热激可能会损伤到卵胞质中的母源因子, 即使与正常核构成重构胚也依然会导致合子基因表达异常; 并且胞质受到热激损伤会在热激诱导的凋亡机制中起到比核更大的作用。

关键词: 热激; 核质相互作用; 牛孤雌激活胚; 合子基因激活; 凋亡

中图分类号: S823; S814.1

文献标识码: A

文章编号: 0366-3964(2010)10-1253-07

The Effects of Heat Shock on the Development of Bovine Parthenogenetic Embryos *in vitro*

XU Wei, TANG Shuang, LV Zhi-yi, SU Feng, HUA Song, ZHANG Yong*

(Key Laboratory of Animal Reproductive Physiology and Embryo Technology, Ministry of Agriculture, Institute of Biotechnology, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, China)

Abstract: The present study was conducted to investigate the stress response of nuclear or cytoplasmic components to heat shock, and the detrimental effects of heat shock on expression of zygotic genes stage, cell apoptosis and *in vitro* development of bovine embryos. The parthenogenetic embryos were incubated at 38.5 or 41 °C for 7 h, respectively; then the nuclei of embryos cultured at 41 °C were transferred into cytoplasts enucleated at 38.5 °C to construct heat shock nuclei-normal cytoplasm embryos (HN embryos) and 38.5 °C nuclei were transferred into 41 °C cytoplasts to construct heat shock cytoplasm-normal nuclei embryos (HC embryos). The development rate of nuclei-cytoplasm exchange embryos, expression of zygotic activated genes and apoptosis of embryo cells were detected. *In vitro* culture showed that blastocyst formation rate for HC embryos decreased significantly compared to parthenogenetic embryos in control and HN embryos. Incomplete activation of zygotic genes was observed in nuclear exchange embryos, especially in HC embryos. It suggested that heat shock might disrupt some cytoplasmic factors required for zygotic gene activation. Apoptosis induced by heat shock was observed in both HN and HC blastocysts and the incidence of apoptosis in HC blastocysts was significantly higher than that in HN

收稿日期: 2009-11-06

基金项目: 转基因生物新品种培育科技重大专项(2008ZX08007-004)

作者简介: 徐薇(1983-), 女, 山西吕梁人, 硕士生, 主要从事早期胚胎发育机理的研究, Tel: 029-87080092, E-mail: xww318@163.com

* 通讯作者: 张涌, E-mail: zhy1956@263.net

embryos. These results suggested that; although heat shock injuries exist in both nuclear and cytoplasmic components, cytoplasmic component is more susceptible to heat shock than nuclear component.

Key words: heat shock; nuclei-cytoplasm interaction; bovine parthenogenetic embryos; zygotic gene activation; apoptosis

植入前胚胎发育是一个胚胎与母体环境之间相互影响,相互调控的动态过程。在处于第一次细胞分裂期时,胚胎正经历着形态结构上的剧烈变化,且基因组还处于低转录活性的状态。因此,此时的胚胎对某些外界环境压力特别敏感。当环境压力加大时,会强烈地影响到胚胎基因的正常表达,并导致后续发育的异常^[1]。发烧或由天气炎热引起的热应激都可以造成母体体温升高,这一母体环境的改变会对胚胎的生存造成重大的影响。胚胎暴露于高温,会导致蛋白质合成减少,发育率下降^[2-3],甚至存活力降低^[2-4]。但是目前仍不清楚胚胎对热激的易感性是由于细胞核还是细胞质所引起的。

合子基因激活(ZGA)在植入前胚胎发育中具有重要的作用。在胚胎发育早期,主要是一些储存在卵胞质中的母源因子调控着胚胎的重构和发育,直到合子的基因组激活后,胚胎才由母源控制转变为合子控制模式^[5-8]。热激会导致胚胎发育率降低,而这种现象通常与胚胎基因的表达异常有关。细胞凋亡是一种程序化的细胞死亡,是胚胎发育过程中的正常现象^[9],也是胚胎在受到外界损害时的一种自我保护机制^[10]。但是高发生率的凋亡现象被认为是胚胎发育异常的表现。在植入前胚胎中,热激会诱导胚胎发育调控的凋亡现象的发生^[10-12]。之前的报道并未研究当胚胎的核质同时受到热激时,哪一部分会受到更大的影响,并在后期的诱导凋亡中起到主导作用。阐明这一问题将为研究胚胎在热激过程中调控凋亡的具体机制提供理论基础。

本试验将正常培养的孤雌激活胚胎与热激胚胎进行核质置换后,检测核质置换胚胎的体外发育率、合子激活基因的表达以及胚胎凋亡情况,根据这些结果探讨分析了热激对牛胚胎核与胞质的不同影响,以及受热激后的核与胞质在合子基因激活和调控凋亡上的不同作用。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试剂 除特殊注明外,本研究中所用试剂

均购自 Sigma 公司。MEM 必需氨基酸溶液、MEM 非必需氨基酸溶液、胎牛血清(FBS)和 TCM-199 培养基购自 Gibco 公司。人尿促性腺激素(HMG)购自 Serono 制药公司。

1.1.2 卵母细胞采集 牛卵巢采自西安市屠宰场,用无菌生理盐水(含 $100 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素 + $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 链霉素)清洗后,放入装有 $25 \sim 30 \text{ }^\circ\text{C}$ 无菌生理盐水的保温瓶运回实验室。去除卵巢表面的结缔组织和脂肪,用无菌生理盐水冲洗干净。用带 12 号针头的注射器抽吸卵巢表面直径 $2 \sim 8 \text{ mm}$ 的卵泡,抽取的卵泡液用含 $0.5 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 肝素和 5% (v/v)FBS 的 PBS 稀释,体视显微镜下收集胞质呈均匀黑色并有 3 层以上致密卵丘颗粒细胞包围的卵丘-卵母细胞复合体(COCs)。

1.2 试验方法

1.2.1 卵母细胞的 BCB 染色^[13] 将收集的 COCs 在含有 0.4% BSA 的无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} PBS (PBS-BSA)中洗 3 次,然后放入含有 $26 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BCB 的 PBS-BSA 中,在 $38.5 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光湿润的环境中染色 90 min。染色结束后,将 COCs 在 PBS-BSA 中清洗 2 次,于体视显微镜下选择胞质呈蓝色的 COCs。

1.2.2 体外成熟培养 牛卵母细胞体外成熟培养液(OM) ($9.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ M199 + $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Hepes + $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 丙酮酸钠 + $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 谷氨酰胺 + $0.075 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 尿促性素(HMG) + $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 17- β 雌二醇(17-E2) + 10% FBS)预先在 $38.5 \text{ }^\circ\text{C}$, $5\% \text{ CO}_2$, 饱和湿度条件下平衡 2 h 以上。将收集的 COCs 在 PBS 中洗 3 次,再用预平衡的成熟液清洗 2 次后移入成熟液,在 $38.5 \text{ }^\circ\text{C}$, $5\% \text{ CO}_2$, 饱和湿度条件下培养 $20 \sim 24 \text{ h}$ 。卵母细胞经体外成熟培养后,于含 0.1% 透明质酸酶的无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} PBS 中消化 3 min,并用吸管反复吹打去除卵丘细胞后,用 PBS 清洗 3 次,在体视显微镜下选择排出第一极体并形态良好的卵母细胞待用。

1.2.3 卵母细胞孤雌激活及热激处理 激活液预先在 $38.5 \text{ }^\circ\text{C}$, $5\% \text{ CO}_2$, 饱和湿度条件下平衡 2 h

以上。将成熟卵母细胞于含 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 离子霉素 (Ionomycin) 的 SOFaa 中激活 4 min, 用 SOFaa 清洗 3 次, 然后移入含 $1.9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-DMAP 的 SOFaa 中 $38.5 \text{ }^\circ\text{C}$, $5\% \text{ CO}_2$, 饱和湿度条件下培养 4 h。将激活后的胚胎随机分组, 一组于 $38.5 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 7 h, 另一组置于 $41 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 7 h, 随后进行核置换操作。

1.2.4 核置换 将上述 2 组胚胎分别置于含 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Hoechst 33342 的 PBS 中染色 5 min, 在含有 $7.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 细胞松弛素 B(CB) 和 $10\% \text{ FBS}$ 的 PBS 微滴中进行核置换操作。于荧光显微镜下调整核的位置, 用去核针吸出一小团核胞质团。尽量缩短照射时间及分组操作, 以减少紫外线对胚胎的损伤。去除核胞质团的卵置于预平衡的 SOFaa 培养液中在培养箱内恢复 20 min 后, 将另一组的核胞质团沿透明带上的孔注射到卵周隙内, 于预平衡的 SOFaa 培养液中在培养箱内恢复 20 min。重组体在电融合液 ($0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇、 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钙、 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸镁、 $0.27 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组氨酸、 $0.1\% \text{ BSA}$) 中预平衡 4~6 min, 然后进行融合, 参数为 28 V , $20 \mu\text{s}$, 2 次。充分洗净融合液后, 进行体外培养。

1.2.5 胚胎体外培养 将每 8~10 枚孤雌激活胚胎或融合的重构胚胎移入预先平衡的 $50 \mu\text{L}$ 含有 $8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ BSA 的 SOFaa 微滴中, 于 $38.5 \text{ }^\circ\text{C}$,

$5\% \text{ CO}_2$, 饱和湿度条件下培养 72 h; 再转入含有 $10\% \text{ FBS}$ 的 SOFaa 中继续培养 96 h, 每隔 48 h 半量换液。分别在 48 和 168 h 时观察卵裂率和囊胚发育情况。

1.2.6 RT-PCR 采用 Cellsdirect cDNA Synthesis System (Invitrogen) 进行 8 细胞重构胚胎单胚总 RNA 提取和第一链 cDNA 的合成。分别对 *Bax*、*Hsp70.1*、*Glut5*、*eIF2a* 基因进行检测, PCR 引物序列见表 1, PCR 反应程序为, $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, 50 或 $57 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, 共 30 个循环。将 $5 \mu\text{L}$ PCR 产物上样于 $1\% \text{ 琼脂糖凝胶电泳}$ 进行检测。

1.2.7 凋亡检测 采用 DeadEnd Fluorometric TUNEL System (Promega) 进行 2 细胞期、8 细胞期和囊胚凋亡检测。各步骤间均用 PBS/PVP 洗涤 3 次, 每次 5 min。胚胎在 $4\% \text{ 多聚甲醛溶液}$ 中固定 1 h; 随后置于 $0.2\% \text{ Triton X-100}$ 中 5 min 进行透性处理; 再移入 Equilibration Buffer (Promega) 中, 预平衡 8 min; 接着将胚胎移入 $50 \mu\text{L}$ 工作液 ($5 \mu\text{L}$ FITC-conjugated dUTP + $1 \mu\text{L}$ terminal deoxynucleotidyl transferase + $45 \mu\text{L}$ Equilibration Buffer) 中, 置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光反应 60 min; 在 $2 \times \text{SSC}$ 溶液中孵育 15 min 终止反应; 在黑暗条件下将样品置于含 $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ RNase A 和 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ PI 的 PBS/PVP 中 15 min 进行细胞核复染。封片后在 LSM-510 激光共聚焦显微镜 (Carl Zeiss) 下观察。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primers used in PCR amplification

基因 Gene	NCBI 检索号 Accession No.	引物序列(5'-3') Primer sequence	退火温度/ $^\circ\text{C}$ T_m	产物大小/bp Fragment size
<i>Bax</i>	NM_173894	CATTGGACTTCCTTCGAG	50	108
		AGATGGTCACTGTCTGCC		
<i>Hsp70.1</i>	BTU02891	AGAGCATCAACCCCGACGA	57	247
		TACACCTGGATCAGCACGC		
<i>Glut5</i>	BC151530	GTGGATGCGGAGATAGAG	50	338
		GCGGTGAAACAGACAGAG		
<i>eIF2a</i>	NM_001102283	GGTCAGAAGATGAAACGC	50	482
		CATGAACCCATACACGGC		

1.3 试验设计

试验一: 将孤雌激活胚随机分为 2 组, 一组于 $38.5 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 7 h, 另一组置于 $41 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 7 h; 随后在 2 组胚胎中随机挑选一部分进行核质置换, 构建热激核-正常胞质重构胚(热激核组)以及热激胞质-正常核

重构胚(热激胞质组)。以正常孤雌激活胚胎(孤雌激活组)及热激的孤雌胚胎(热激孤雌激活组)为对照(体外放置时间和荧光染色均与试验组相同, 以降低试验误差), 体外培养后, 观察 4 组胚胎发育情况。

试验二: 使用 RT-PCR 检测两种重构胚在 8 细

胞期合子激活基因的表达情况,以正常孤雌激活胚胎作为对照组。分析核质在热应激后的相互作用对合子基因激活的影响。

试验三:使用 TUNEL 检测 4 组胚胎在 2 细胞期、8 细胞期和囊胚的凋亡情况。以热激孤雌激活胚胎为阳性对照,分析核质在热应激后的相互作用对后期胚胎质量的影响。

1.4 统计分析

所有试验均重复 3 次以上,凋亡和囊胚细胞计数由 3 人独立观察计数。凋亡指数(apoptotic index) = 凋亡细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ 。试验数据使用 SigmaStat 3.5(Systat Software, Inc., Richmond, CA) 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA)。在 $P < 0.05$ 时,认为试验组间存在显著差异。

2 结果

2.1 热激后核质置换胚胎的体外发育

各试验组的体外发育结果如表 2 所示:2 组重构胚均可发育到囊胚。其中热激核-正常胞质重构胚的体外发育率与正常孤雌激活胚胎无显著差异。但当卵母细胞胞质热激 7 h 后,胚胎发育率显著下降($P < 0.05$)。

表 2 热激后核质置换胚胎的体外发育

Table 2 *In vitro* development of nucleus-cytoplasm exchange embryos after heat shock

胚胎来源 Origin of embryos	胚胎数 No. of embryos	发育至各期的胚胎数/% No. of embryos developed to	
		2 细胞 2-cell	囊胚 Blastocyst
孤雌激活组 Parthenogenetic	160	88.8(142)	41.3(66) ^a
热激核组 Heat shock nuclei	176	79.5(140)	29.5(52) ^a
热激胞质组 Heat shock cytoplasm	152	59.2(90)	10.5(16) ^b
热激孤雌激活组 Heat shock parthenogenetic	164	47.6(78)	6.1(10) ^b

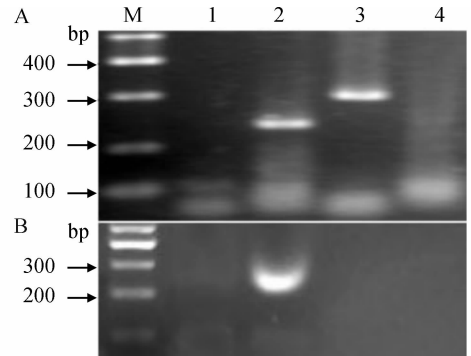
^{a, b}. 同列中带有不同上标的数据间具有显著性差异($P < 0.05$)

^{a, b}. Within the same column, values with different superscripts are significantly different

2.2 合子激活基因在核质置换胚胎中的表达情况

在 2 组重构胚中各随机选取 10 枚 8 细胞期胚胎进行合子激活基因表达分析。在热激核-正常胞质重

构胚组中,有一枚胚胎被检测到合子基因激活不完全(图 1A)。在热激胞质-正常核重构胚组中,2 枚胚胎完全没有检测到合子基因表达,另有 1 枚只检测到了 *Hsp70.1* 基因的表达(图 1B),这表明在热激后进行核质置换的胚胎中存在合子基因激活不完全的现象。



A. 热激核-正常胞质重构胚的合子激活基因表达情况; B. 热激胞质-正常核重构胚的合子激活基因表达情况。M. DNA 相对分子质量标准; 1. *Bax*; 2. *Hsp70.1*; 3. *Glut5*; 4. *eIF2a*

图 1 热激后 8 细胞期核质置换胚胎中合子激活基因的表达情况

Fig. 1 Expression of zygotic activated genes in 8-cell nucleus-cytoplasm exchange embryos

2.3 热激后核质置换胚胎的凋亡情况

采用 TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) 标记法进行胚胎细胞凋亡检测。在 8 细胞期,4 个试验组均出现核凝集现象,但只有热激孤雌激活组检测出凋亡细胞(图 2A)。对囊胚期胚胎的检测结果表明,4 个试验组的凋亡指数从高到低依次为:热激孤雌激活组,热激胞质-正常核重构胚组,热激核-正常胞质重构胚组,正常孤雌激活组,且各组之间差异显著($P < 0.05$,图 2B)。

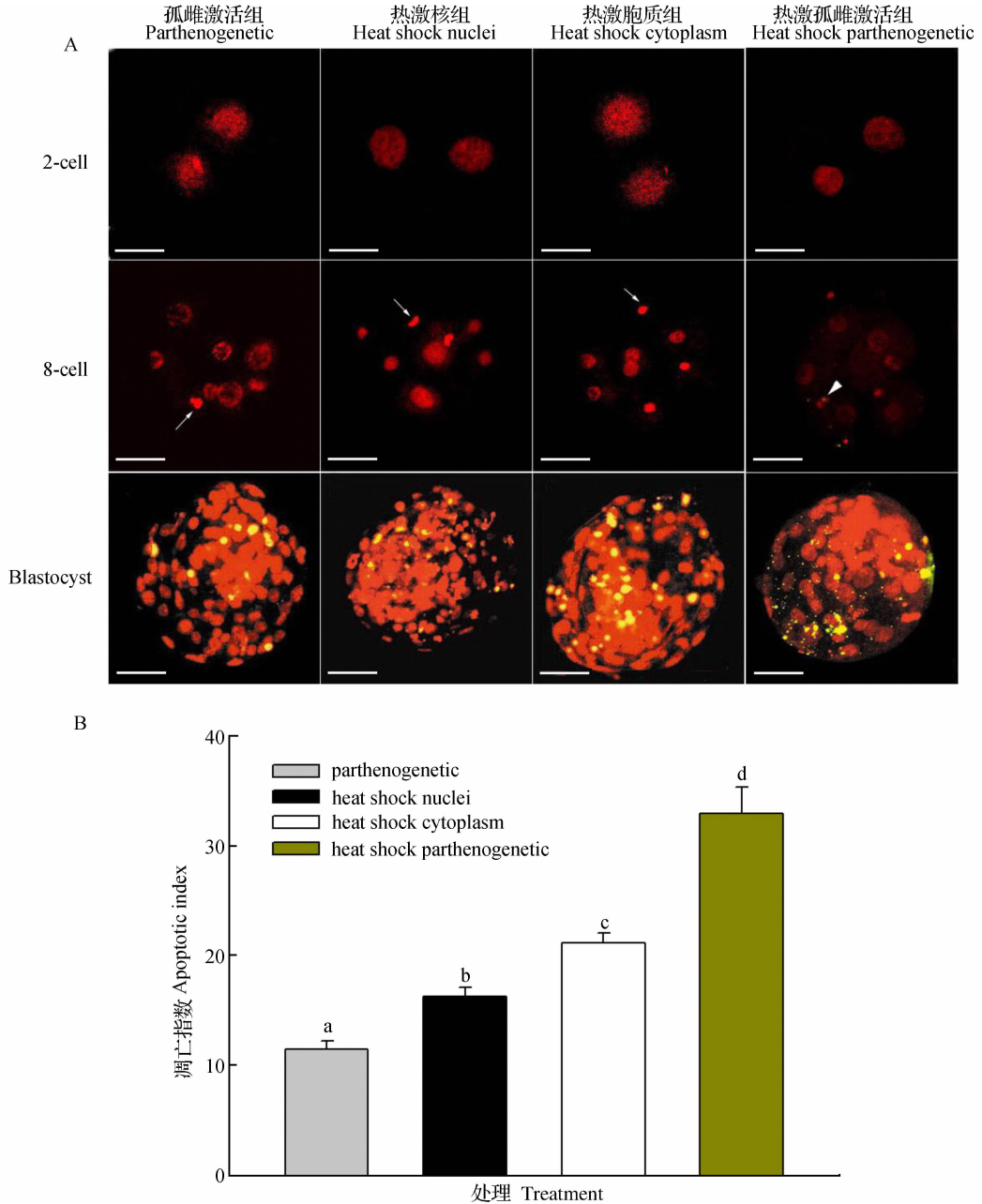
3 讨论

3.1 热激后核与胞质对胚胎发育的影响

本试验将正常培养的胚胎与热激胚胎进行核质置换,以探讨热激对胚胎细胞核与胞质的不同影响。体外培养的结果显示,热激核-正常胞质重构胚、热激胞质-正常核重构胚以及热激孤雌激活胚组均可发育到囊胚,这表明热激后的核和胞质均可支

持胚胎发育。但与孤雌激活胚胎和热激核-正常胞质重构胚相比,热激胞质-正常核重构胚的发育能力显著下降,这表明早期胚胎的核与胞质对热激的易

感性并不相同,早期胚胎热激后发育能力下降主要是由胞质损伤所引起的。



A. 孤雌激活胚、热激核-正常胞质重构胚、热激胞质-正常核重构胚以及热激孤雌激活胚在不同时期的凋亡图。箭头表示凝集的核;大箭头表示 8 细胞中的凋亡核(黄色)。比例尺:40 μm 。B. 热激对核质置换胚胎囊胚细胞凋亡的影响。凋亡指数 = 凋亡细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ 。数据为平均值 \pm 标准误,不同上标代表组间数据存在显著差异($P < 0.05$)

A. Representative images of TUNEL labeling in parthenogenetic, heat shock nucleus-cytoplasm, nucleus-heat shock cytoplasm and heat shock parthenogenetic embryos. Arrow indicate condensed nucleus. Arrow head indicate apoptosis nucleus (yellow). Scale bar: 40 μm . B. Effect of heat shock on apoptosis in blastocysts derived from nucleus-cytoplasm exchange embryos. The formula for apoptosis index = apoptotic cell number/ total cell number $\times 100\%$. Data presented by Mean \pm S. E. M. The different superscripts above each bar mean significant difference ($P < 0.05$)

图 2 热激对核质置换胚胎凋亡的影响

Fig. 2 Apoptosis in nucleus-cytoplasm exchange embryos after heat shock

3.2 热激后核与胞质对合子基因激活的影响

合子基因激活(ZGA)是植入前胚胎发育的一个重要事件。合子的基因组激活后,胚胎发育由母源性调控逐步转变为合子控制模式^[5-7],一些发育过程中的重要基因也是从该阶段起始表达。胚胎发育过程中会面对热应激、低 pH 值、缺氧等一系列的环境压力,热休克蛋白 Hsp70.1 的适时表达能够阻止受损蛋白质的降解,并促进胚胎细胞在压力环境下的再修复^[14-18],另外,它还可以抑制细胞凋亡,从而对胚胎产生一定的保护作用^[19]。早期胚胎发育主要利用丙酮酸钠提供能量,合子基因组激活后,则由葡萄糖来充当主要的能源物质^[20-21]。glut5 是一种单糖转运蛋白,该蛋白与其家族的其他成员合作,参与葡萄糖从膜外向膜内的转运,从而为这个时期胚胎代谢提供能量^[22]。真核翻译起始因子 eIF 参与蛋白质的合成、mRNA 降解、细胞增殖、细胞周期的转化及细胞衰老与凋亡等,在胚胎发育过程中具有不可或缺的重要作用^[23]。Bax 是一种促凋亡基因,Bax 蛋白能够形成二聚体,在膜上打开通道,增加通透性从而促进细胞凋亡;或者与 Bcl-2 形成异聚体,降低通透性,以抑制细胞凋亡,从而在细胞凋亡过程中起着重要的作用^[24]。

本试验对 4 种 ZGA 期起始表达的基因进行检测,结果显示,热激后的核质置换胚胎中存在合子基因激活不完全的现象。这一情况在热激胞质-正常核重构胚中尤为明显。研究表明,卵母细胞胞质中储存大量的母性 mRNA 和蛋白质,这些蛋白质以及 mRNA 翻译产生的蛋白质,包含着启动并指导合子基因组表达的重要的转录因子^[25-26]。当胞质发生热应激时,可能会诱使这些蛋白质发生变性损伤,从而破坏了胞质中的转录起始因子,造成合子基因组表达异常。此外,母源性因子能够通过染色质进行修饰,在合子基因激活的时序调控中发挥重要作用。当母源性因子受损时,它对染色质的结构调节失效,进一步导致合子基因表达的抑制。

3.3 热激后核与胞质对胚胎凋亡的调控作用

本试验检测了孤雌胚胎、热激核-正常胞质重构胚、热激胞质-正常核重构胚以及热激孤雌激活胚在 2 细胞期、8 细胞期和囊胚期的凋亡情况。孤雌胚胎、热激核-正常胞质重构胚和热激胞质-正常核重构胚在 2 细胞和 8 细胞期胚胎都未检测到 TUNEL 阳性细胞,但在 8 细胞胚胎中出现了核凝集的现象,表现出了细胞凋亡的形态学特征^[16];而在热激孤雌

激活胚中 8 细胞胚胎已经可以检测到 TUNEL 阳性信号。牛胚胎的自发凋亡最早出现在 8-16 细胞期,这与胚胎基因组激活正处于同一时期,因此很可能合子基因转录在胚胎凋亡中起一定的作用^[1,11,15-16]。此外,环境压力(如热激或药物处理)会使卵裂球在应激反应的作用下开启细胞自我保护机制,从而引起程序化的细胞凋亡发生^[8,11,17]。在本研究中,与孤雌激活囊胚相比,热激处理的核质置换胚胎具有更高的细胞凋亡率,也与这一观点相一致。同时也表明当核或胞质受到热激损伤后,即使与未受损的胞质或核重构成新的胚胎,也会通过核质相互作用影响到基因的表达和细胞凋亡。本试验中,与来源于热激核-正常胞质重构胚的囊胚相比,热激胞质-正常核重构囊胚具有更高的凋亡细胞数。这一结果表明,当胚胎受到热激时,胞质会受到更大的影响,进而在后期的诱导凋亡中起到主导作用。

4 结 论

本研究设计使用正常培养的胚胎与热激胚胎构建的核质置换胚来研究早期胚胎核与胞质对热激的应激反应,以及产生应激后二者之间的相互作用。结果表明,虽然热激对二者都有损伤,但胞质对热激损伤更为敏感。早期胚胎受到热激后导致发育能力降低的易感性主要是由于胞质所引起的;早期胚胎受到热激可能会损伤到卵胞质中的母源因子,即使与正常核构成重构胚也依然会导致合子基因表达异常;并且胞质受到热激损伤会在热激诱导的凋亡机制中起到比核更大的作用。

参考文献:

- [1] MEMILI E, FIRST N L. Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species [J]. *Zygote*, 2000, 8(1):87-96.
- [2] EDWARDS J L, EALY A D, HANSEN P J. Regulation of heat-shock protein-70 synthesis by heat-shock in the preimplantation murine embryo [J]. *Theriogenology*, 1995, 44(3):329-337.
- [3] EDWARDS J L, HANSEN P J. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock [J]. *Mol Reprod Dev*, 1997, 46(2):138-145.
- [4] EALY A D, DROST M, HANSEN P J. Developmental-changes in embryonic resistance to adverse-effects of maternal heat-stress in cows [J]. *Dairy*

- Sci*,1993, 76(10):2899-2905.
- [5] SCHULTZ R M. Regulation of zygotic gene activation in the mouse [J]. *Bioessays*,1993, 15(8):531-538.
- [6] SCHULTZ R M, DAVIS W, Jr STEIN P, et al. Reprogramming of gene expression during preimplantation development [J]. *Exp Zool*,1999, 285(3):276-282.
- [7] MINAMI N, SUZUKI T, TSUKAMOTO S. Zygotic gene activation and maternal factors in mammals [J]. *Reprod Dev*,2007, 53(4):707-715.
- [8] JOUSAN F D, HANSEN P J. Insulin-like growth factor-I as a survival factor for the bovine preimplantation embryo exposed to heat shock [J]. *Biol Reprod*,2004, 71(5):1665-1670.
- [9] POTTS D M, WILSON I B. The preimplantation conceptus of the mouse at 90 hours post coitum [J]. *Anat*,1967, 102(1):1-11.
- [10] KRININGER C E, STEPHENS S H, HANSEN P J. Developmental changes in inhibitory effects of arsenic and heat shock on growth of pre-implantation bovine embryos [J]. *Mol Reprod Dev*,2002, 63(3):335-340.
- [11] PAULA-LOPES F F, HANSEN P J. Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon [J]. *Biol Reprod*,2002, 66(4):1169-1177.
- [12] ROTH Z, HANSEN P J. Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation [J]. *Biol Reprod*,2004, 71(6):1898-1906.
- [13] 曹泽磊,苏建明,胡广卫,等.亮甲酚兰染色法筛选卵母细胞对牛体细胞克隆胚胎体外发育的影响 [J]. *动物医学进展*,2009,30(9):24-28.
- [14] WELLS D N, MISICA P M, TERVIT H R. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells [J]. *Biol Reprod*,1999, 60(4):996-1005.
- [15] BYRNE A T, SOUTHGATE J, BRISON D R, et al. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL [J]. *Reprod Fertil*, 1999, 117(1):97-105.
- [16] GJORRET J O, KNIJN H M, DIELEMAN S J, et al. Chronology of apoptosis in bovine embryos produced *in vivo* and *in vitro* [J]. *Biol Reprod*,2003, 69(4):1193-1200.
- [17] PAULA-LOPES F F, HANSEN P J. Apoptosis is an adaptive response in bovine preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock [J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2002, 295(1):37-42.
- [18] CHANDOLIA RK, PELTIER MR, TIAN W, et al. Transcriptional control of development, protein synthesis, and heat-induced heat shock protein 70 synthesis in 2-cell bovine embryos [J]. *Biol Reprod*, 1999, 61(6):1644-1648.
- [19] WELCH W J. Mammalian stress response; cell physiology, structure/function of stress proteins and implications for medicine and disease [J]. *Physiol Rev*,1992,72(4):1063-1081.
- [20] HART F U, HAYER-HART. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein [J]. *Science*,2002,295(5561):1852-1858.
- [21] PAULA-LOPES F F, HANSEN P J. Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon [J]. *Biol Reprod*,2002,66(4): 1169-1177.
- [22] AUGUSTIN R, POCAR P, NAVARRETE-SANTOS A. Glucose transporter expression is developmentally regulated *in vitro* derived bovine preimplantation embryos [J]. *Mol Reprod*,2001,60(3):370-376.
- [23] 徐宏勇,李开宗,付由池. 肝细胞癌中促凋亡基因 bax 的原位检测及其临床意义 [J]. *中国普外基础与临床杂志*,2000,7(4):31-33.
- [24] 时广红,王彦珍,魏建华. eIF-5A 与 DHS 功能研究及应用进展 [J]. *生物技术通报*, 2009,5:21-26.
- [25] SAUER F T, JAN R. Mechanisms of transcriptional activation; differences and similarities between yeast drosophila and man [J]. *Curr Opin in Genetics and Develop*,1997,7(2):176-181.
- [26] MAJUMBER S,DEPAMOHILIS M L. A unique role for enhancers is revealed during early mouse development [J]. *Bioessays*,1995,17(10): 879-889.

(编辑 郭云雁)