

## 电脉冲与化学激活联合处理对猪卵母细胞孤雌发育的影响

蔡元<sup>1,2</sup> 张兆旺<sup>2</sup> 田见晖<sup>1</sup> 朱士恩<sup>1</sup> 刘国世<sup>1</sup> 成文敏<sup>1</sup> 曾申明<sup>1</sup> 李迎<sup>1</sup>

(1. 中国农业大学 动物科学技术学院,北京 100094; 2. 甘肃农业大学 动物科学技术学院,兰州 730070)

**摘要** 探讨了猪卵母细胞电激活后间隔不同时间用化学药物处理对猪卵母细胞孤雌发育的影响。结果表明: 1) 电激活后间隔 0, 3, 4, 5 和 6 h 再分别用 6-二甲氨基嘌呤(6-Dimethylaminopurine, 6-DMAP)、放线菌酮(cycloheximide, CHX)处理 6 h, 各组卵裂率、囊胚细胞数差异不显著( $P > 0.05$ ), 但在 6-DMAP 组中对照组囊胚率极显著高于其余各组( $P < 0.01$ ), 在 CHX 组中对照组囊胚率极显著高于间隔 5 和 6 h 组( $P < 0.01$ ), 而其余各组之间差异不显著( $P > 0.05$ ); 2) 电激活后间隔 4 h 再分别用 6-DMAP, CHX 和细胞松弛素 B(Cytochalasin B, CB) + 6-DMAP 处理 6 h, 各组卵裂率差异不显著( $P > 0.05$ ), 对照组囊胚率极显著高于其余各组( $P < 0.01$ ), 其余各组囊胚率显著性均无差异( $P > 0.05$ )。对照组中无单倍体囊胚, 二倍体囊胚为 88.24%, 但 6-DMAP, CHX, CB + 6-DMAP 中产生的囊胚大部分是单倍体, 且三者之间无显著性差异( $P > 0.05$ )。以上结果说明, 猪卵母细胞电激活后间隔一段时间再用 DMAP 和 CHX 激活, 激活作用随时间的延长而减弱; 猪卵母细胞电激活后 4 h 再用 6-DMAP, CHX, CB + 6-DMAP 激活, 产生的囊胚大部分为单倍体, 该方法适于猪卵母细胞 ICSI 的激活。

**关键词** 猪; 卵母细胞; 孤雌发育; 核型

中图分类号 S 814.8

文章编号 1007-4333(2004)03-0021-04

文献标识码 A

## Effects of electrical pulses combined with chemical activation on the parthenogenetic development of porcine oocytes

Cai Yuan<sup>1,2</sup>, Zhang Zhaowang<sup>2</sup>, Tian Jianhui<sup>1</sup>, Zhu Shien<sup>1</sup>, Liu Guoshi<sup>1</sup>,  
Cheng Wenmin<sup>1</sup>, Zeng Shenming<sup>1</sup>, Li Ying<sup>1</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. College of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

**Abstract** The objective of this study was to determine the effects of chemical treatment after electric activation in different intervals on the parthenogenetic development of porcine oocyte. Porcine oocytes were cultured in vitro for 0 (control), 3, 4, 5 and 6 h after electrical activation, they were then incubated in 6-DMAP/CHX. There were no significant differences ( $P > 0.05$ ) in the mean numbers of nuclei per blastocysts and cleavage rate. But the blastocysts rate of the control group with 6-DMAP was significantly higher than other groups ( $P < 0.05$ ). Blastocyst rate of the control group with CHX was higher than the groups with 5 and 6 h intervals, ( $P < 0.05$ ). In the parallel study, there were no significant differences in the cleavage rates ( $P > 0.05$ ), but the blastocyst rate of the control group was higher than other groups ( $P < 0.05$ ). The blastocysts cultured in control almost were diploids, while most blastocysts in other groups were haploids, and there was no significant difference ( $P > 0.05$ ). These results demonstrate that the activating effect gradually declines as the interval time gets longer, and most blastocysts activated by electricity and 6-DMAP, CHX, CB + 6-DMAP (with 4 h interval between them) mostly are haploid.

**Key words** porcine; oocytes; parthenogenetic development; karyotype

卵母细胞激活对提高卵母细胞胞质内单精子注射(ICSI)的成功率具有重要作用<sup>[1,2]</sup>,由于激活方法不同,孤雌发育的胚胎细胞可形成单倍体、二倍体

和多倍体<sup>[3]</sup>,只有形成单倍体才有利于 ICSI 获得正常二倍体胚胎。采用单纯电脉冲激活的卵母细胞孤雌发育胚胎,大部分为单倍体<sup>[4]</sup>,但其囊胚发育率

收稿日期: 2004-03-01

基金项目: 北京市科委重点资助项目(H022020060420); 北京市科技新星计划资助项目(H020820630120)

作者简介: 蔡元,硕士研究生;田见晖,副教授,博士,通讯作者,主要从事胚胎生物技术研究, E-mail: tianjh@cau.edu.cn

很低。为了提高卵母细胞孤雌发育率,常将电脉冲激活与 CB, 6-DMAP 和 CHX 等化学物质联合使用<sup>[5,6]</sup>,但由于 CB 和 6-DMAP 具有抑制卵母细胞第二极体排出的作用,导致孤雌发育的胚胎多为二倍体<sup>[4,7]</sup>。为了避免化学物质处理对第二极体排出的抑制作用,将牛、绵羊的 ICSI 卵在激活后间隔一段时间,待第二极体排出后再采用化学药物处理<sup>[8,9]</sup>,从而保证 ICSI 获得正常二倍体胚胎。目前,在猪上尚未见有关报道。本研究观察了用此方法对猪卵母细胞孤雌发育的影响,旨在探寻适于猪卵母细胞 ICSI 的激活方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 化学试剂

本研究用于卵母细胞成熟、激活以及孤雌胚发育所涉及的生化试剂除标注外均购自 Sigma 公司。配制各种液体所用水均为经 MilliQ 过滤的超纯水。

### 1.2 卵母细胞的采集与成熟培养

从刚屠宰的猪体内摘取卵巢,保存在 30~35 生理盐水(NaCl 分析纯级,北京化工厂生产)中 2 h 内运回实验室备用。卵巢经灭菌生理盐水冲洗 3 次后,用 16G 针头的注射器抽取  $d$  为 2~8 mm 卵泡中的卵丘细胞-卵母细胞复合体(COCs),2 h 内抽完。抽取液注入 15 mL 尖底离心管,并置于 37 水浴槽中。待 COCs 沉降后,用 TL-Hepes + 0.3% (质量分数)牛血清白蛋白(BSA) (购自罗氏公司)洗涤 2 次。挑选有数层完整颗粒细胞且胞质均匀的 COCs 用成熟培养液,洗涤 3 次后用  $d$  为 60 mm 塑料平皿或 4 孔细胞培养板培养(均为 Nunc 公司生产)。平皿培养时,每滴 80  $\mu$ L 培养液放入 20~25 个 COCs,加盖矿物油。用 4 孔培养板培养,每孔 50~70 个 COCs 培养液为 500  $\mu$ L。成熟培养液用 TCM199<sup>[5]</sup> (购自 Gibco) 加 10% (体积分数)的猪卵泡液、0.1 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 半胱氨酸、10 ng  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 表皮生长因子(EGF)、10 U  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 孕马血清促性腺激素(PMSG)、10 U  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 人绒毛膜促性腺激素(hCG)、0.065 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 青霉素、0.05 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 链霉素,培养 44~46 h。培养条件为温度 38.5,空气中 CO<sub>2</sub> 体积分数为 5%,湿度 100%。

### 1.3 卵母细胞的激活

1) 去除颗粒细胞。培养 44 h 后,将 COCs 移入 0.1% (质量分数)透明质酸酶中用移液枪轻轻吹打 100~150 次,然后移入 M199-Hepes + 3% (体积分

数)胎牛血清(FBS)液滴中,选取胞质均匀形态正常且排出第一极体的卵母细胞,存放于 37 恒温台上备用。

2) 电激活。激活前将卵母细胞放入激活液中洗涤、平衡 1~3 min,然后移入电融合小室与电极平行排放。电融合仪为日本富士平公司生产的 Embryo cell fusion system ET-3。电激活参数为场强 1.3 kV  $\cdot$  cm<sup>-1</sup>、脉冲时程 80  $\mu$ s、1 次脉冲。激活液为 0.3 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 甘露醇,0.05 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>,0.1 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>。

### 1.4 胚胎培养

电激活后,根据试验设计要求将卵母细胞移入相应的化学物质中处理,然后放入 50  $\mu$ L NCSU23 + 4 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> BSA 液滴中培养,每滴 15~20 枚胚胎,加盖矿物油。培养条件为温度 38.5,空气中 CO<sub>2</sub> 体积分数为 5%,湿度 100%。

### 1.5 试验设计

1) 电激活后间隔不同时间用 6-DMAP 处理对猪卵母细胞孤雌发育的影响。猪体外成熟卵母细胞电激活后,随机分为 6 组,分别在 NCSU23 + 4 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> BSA 发育液中培养 0(对照),3,4,5,6 和 7 h,然后用含有 6-DMAP(2 mmol)的 NCSU23 + 4 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> BSA 发育液处理 6 h,最后移入 NCSU23 + 4 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> BSA 发育液中培养至第 7 天。激活后第 2 天记录卵裂数,第 7 天观察囊胚数和囊胚细胞计数。

2) 电激活后间隔不同时间用 CHX 处理对猪卵母细胞孤雌发育的影响。猪体外成熟卵母细胞电激活后,随机分为 6 组,分别在 NCSU23 + 4 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> BSA 发育液中培养 0(对照),3,4,5,6 和 7 h,然后用含有 CHX(10  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>)的发育液处理 6 h,最后移入 NCSU23 + 4 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> BSA 发育液中培养至第 7 天。激活后第 2 天记录卵裂数,第 7 天观察囊胚数和囊胚细胞计数。

3) 电激活后间隔 4 h 用不同药物处理对猪卵母细胞孤雌发育的影响。猪体外成熟卵母细胞电激活后,随机分为 4 组,对照组直接放入用含有 6-DMAP(2 mmol)的 NCSU23 + 4 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> BSA 发育液处理 6 h;另外 3 组均在 NCSU23 + 4 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> BSA 发育液中培养 4 h,然后分别用含有 6-DMAP(2 mmol),CB(7.5 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>) + 6-DMAP(2 mmol)和 CHX(10  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>)的 NCSU23 + 4 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> BSA 发育液处理 6 h。各组移入 NCSU23 + 4 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>

BSA 发育液中培养至第7天。第7天观察囊胚数和胚胎细胞核型。

### 1.6 胚胎的染色体核型观察

将培养至第7天的囊胚放在含  $0.05 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  秋水仙胺的发育液中培养 4~5 h, 然后放入 1% (质量分数) 柠檬酸钠低渗液中处理 20 min。将囊胚从 40~50 cm 高处滴加到 -4 的载玻片 (经冰箱预冷) 上, 使染色体均匀分散, 再用  $1.5 \mu\text{L}$  固定液 ( $V(\text{甲醇}) : V(\text{乙酸}) = 1 : 1$ ) 固定, 最后用  $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  Hoechst33342 染色, 荧光显微镜 1000 倍视野观察<sup>[5]</sup>。

### 1.7 囊胚细胞的计数

采用  $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  Hoechst 33342 染色压片, 在

荧光显微镜下记录囊胚细胞数。

### 1.8 数据分析

采用 *t* 检验法。

## 2 结果

### 2.1 电激活后间隔不同时间用 6-DMAP 处理对猪卵母细胞孤雌发育的影响 (表 1)

在表 1 中各组之间卵裂率、囊胚细胞数差异不显著 ( $P > 0.05$ )。间隔 3~6 h 组的囊胚率显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ), 其余各组差异不显著 ( $P > 0.05$ )。随着间隔时间的增加囊胚率呈下降趋势, 说明电激活后化学物质对卵母细胞的激活作用因间隔时间的延长而减弱。

表 1 电激活后间隔不同时间用 6-DMAP 处理对猪卵母细胞孤雌发育的影响

Table 1 Effects of 6-DMAP treatment after electric activation in different intervals on the parthenogenetic development of porcine oocytes

间隔时间/h	重复次数	卵数	卵裂率/ %	囊胚率/ %	囊胚细胞数
0(对照)	5	148	52.02 ±6.91 a	17.57 ±7.14 a	23.68 ±6.52 a(26)
3	5	166	46.98 ±8.23 a	7.23 ±4.95 c	22.14 ±8.61 a(12)
4	5	159	47.80 ±7.25 a	7.55 ±6.95 c	21.89 ±7.32 a(12)
5	5	171	44.44 ±3.87 a	5.84 ±5.16 c	20.37 ±5.21 a(10)
6	5	164	48.17 ±8.63 a	3.66 ±2.18 c	20.45 ±4.37 a(6)

注: 同列内不同字母间差异显著 ( $P < 0.05$ ); 括号内为所计囊胚数。下同。

### 2.2 电激活后间隔不同时间用 CHX 处理对猪卵母细胞孤雌发育的影响 (表 2)

在表 2 中各组之间卵裂率、囊胚细胞数差异不显著 ( $P > 0.05$ )。间隔 5, 6 h 组的囊胚率显著低于对照 ( $P < 0.05$ ), 其余各组差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

### 2.3 电激活后间隔 4 h 用不同药物处理对猪卵母细胞孤雌发育的影响 (表 3)

各组卵裂率差异不显著 ( $P > 0.05$ ); 间隔 4 h 的各组囊胚率差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 但与对照组差异显著 ( $P < 0.05$ )。

表 2 电激活后间隔不同时间用 CHX 处理对猪卵母细胞孤雌发育的影响

Table 2 Effects of CHX treatment after electric activation in different intervals on the parthenogenetic development of porcine oocytes

间隔时间/h	重复次数	卵数	卵裂率/ %	囊胚率/ %	囊胚细胞数
0(对照)	4	91	47.52 ±13.23 a	15.38 ±4.48 a	30.43 ±3.76 a(7)
3	4	93	48.06 ±9.72 a	7.52 ±5.66 ab	28.60 ±6.79 a(6)
4	4	93	48.71 ±7.85 a	6.45 ±3.94 ab	29.12 ±5.38 a(3)
5	4	91	45.76 ±6.69 a	3.30 ±2.24 bc	26.44 ±7.41 a(3)
6	4	101	49.45 ±11.23 a	2.97 ±3.00 bc	27.30 ±4.25 a(14)

表 3 化学药物处理对猪卵母细胞孤雌发育的影响

Table 3 Effects of chemical treatments on the parthenogenetic development of porcine oocytes

处理方法	间隔时间/h	重复次数	卵数	卵裂率/ %	囊胚率/ %
6-DMAP	4	5	227	49.34 ±16.98 a	5.72 ±4.15 c
CHX	4	5	230	55.22 ±14.01 a	7.39 ±5.94 c
CB + 6-DMAP	4	5	236	50.85 ±15.92 a	6.36 ±1.80 c
6-DMAP	0(对照)	5	213	53.99 ±16.61 a	15.96 ±5.17 a

2.4 激活方法对猪孤雌发育胚核型的影响(表 4)  
 间隔 4 h 的处理组大部分囊胚为单倍体,各组  
 间差异不显著 ( $P > 0.05$ ),在各组中单倍体的比例

明显高于二倍体和多倍体。对照组中无单倍体,二  
 倍体比率为 88.24%。

表 4 猪孤雌发育胚胎细胞的核型分析

Table 4 The karyotype of parthenogenetic blastocyst in porcine

间隔时间/h	处理方法	囊胚数	单倍体数/ %	二倍体数/ %	多倍体数/ %
4	6-DMAP	11	7 a(63.64)	2 b(18.18)	2 b(18.18)
4	CHX	10	7 a(70.00)	2 b(20.00)	1 bc(10.00)
4	CB + 6-DMAP	10	6 a(60.00)	3 ab(30.00)	1 b(10.00)
0(对照)	6-DMAP	17	0	15 a(88.24)	2 b(11.76)

### 3 讨论与结论

卵母细胞电激活后间隔一段时间再用化学物质  
 激活,其囊胚发育率随间隔时间的延长而下降,说明  
 电激活后化学物质对卵母细胞的激活作用因间隔时  
 间的延长而减弱。其原因有两方面,一是猪卵母细  
 胞的最佳激活时间在成熟后 44 h 左右,随着卵龄的  
 升高孤雌胚的发育率降低<sup>[5]</sup>。二是由核分析结果  
 表明,电激活后间隔一段时间,第二极体排出逐渐增  
 多,形成的孤雌胚以单倍体为主,而单倍体胚胎的发育  
 能力明显较二倍体胚胎差<sup>[4]</sup>。另外,间隔 4 h 与  
 对照的卵裂率和囊胚细胞数无差异,这与有关报道<sup>[9]</sup>  
 一致。

由试验看出,卵母细胞电激活后间隔 4 h 用 CB  
 处理,对卵裂率和囊胚发育率无影响。这可能是电  
 激活后间隔 4 h 卵母细胞的第二极体已大部分排  
 出<sup>[10]</sup>,形成的胚胎主要是单倍体。由此进一步证  
 明,在孤雌激活中 CB 提高囊胚发育率的作用是通过  
 抑制卵母细胞的第二极体排出,使其形成二倍体<sup>[4]</sup>。

在本试验中,电激活后间隔 4 h 再用不同的化  
 学物质激活,孤雌胚的单倍体比例为 60%~70%。  
 这比 Suttner 报道<sup>[2]</sup>,牛卵母细胞 ICSI 后用 Calcium  
 ionophore 激活,再用 CHX 处理,二倍体胚胎的比例  
 为 90%要低。原因可能是,1)激活方法和物种的差  
 异;2)精子注入后形成的受精卵比单倍体孤雌胚有  
 更强的发育力。猪体外成熟卵母细胞在电脉冲激活  
 后,间隔一定时间再用化学药物处理,所发育的孤雌  
 胚大部分为单倍体,表明这种激活方法适合于猪  
 ICSI 卵;但随间隔时间的延长化学药物的激活作用  
 逐渐减弱,囊胚发育偏低,有待进一步探讨提高胚胎  
 发育的途径。猪卵母细胞电激活后间隔 4 h 再用 6-  
 DMAP,CHX 或 CB + 6-DMAP 激活适合于 ICSI。

### 参 考 文 献

- [1] Tesarik J, Mendoza C. Spermatid injection into human oocytes: I. Laboratory techniques and special features of zygote development [J]. Hum Reprod, 1996, 11: 772 ~ 779
- [2] Suttner R, Zakhartchenko V, Stojkovic P, et al. Intracytoplasmic sperm injection in bovine: effects of oocyte activation, sperm pretreatment and injection technique [J]. Theriogenology, 2000, 54: 935 ~ 948
- [3] 范必勤,邓满齐.哺乳动物卵的激活与孤雌发育[J].生物工程进展, 1994, 14(3): 50 ~ 54
- [4] Loi P, Ledda S, Fulka L, et al. Development of parthenogenetic and doned ovine embryos: effect of activation protocols [J]. Biology of Reproduction, 1998, 58: 1177 ~ 1187
- [5] Zhu J, Telfer E, Fletcher J, et al. Improvement of an electrical activation protocol for porcine oocytes [J]. Biology of Reproduction, 2002, 66: 635 ~ 641
- [6] 吴中红,邢凤英,刘国世,等.猪体外成熟卵母细胞的电激活及其激活后的体外培养 [J]. 中国农业科学, 2002, 35: 1537 ~ 1542
- [7] Machaty Z, Prather R S. Strategies for activation nuclear transfer oocytes [J]. Reprod Fertil Dev, 1998, 10: 599 ~ 613
- [8] Horiuchi T, Emuta C, Amauchi Y, et al. Birth of normal calves after intracytoplasmic sperm injection of bovine oocytes: a methodological approach [J]. Theriogenology, 2002, 57: 1013 ~ 1024
- [9] 苟克勉,安晓荣,田见晖,等.绵羊胞内单精子注射技术 [J]. 实验生物学报, 2002, 35: 103 ~ 108
- [10] Kurebayashi S, Miyake M, Katayama M, et al. Development of porcine blastocysts from in vitro-matured and activated haploid and diploid oocytes [J]. Theriogenology, 1996, 46: 1027 ~ 1036