

小鼠早期受精胚细胞核诱导成熟卵母细胞 Ca^{2+} 释放活性的研究

罗晓艳 黄秀英* 孙方臻*

(中国科学院遗传与发育生物学研究所分子发育生物学重点实验室, 北京 100080. * 联系人, E-mail: sunfangzhen@sina.com, suehxy@sina.com)

摘要 在受精过程中, 哺乳动物卵子细胞内的钙离子浓度呈现连续性反复升高. 有证据表明: 将受精的 1-和 2-细胞期的胚胎细胞核移植到未受精卵中能导致卵子产生钙升高并使该重构胚激活. 然而, 尚不清楚胚胎细胞核这种诱导卵子内钙升高的能力是如何获得的, 是否处于不同发育阶段的早期胚胎细胞核都具有这种能力. 利用细胞核移植技术, 将小鼠受精早期胚胎细胞核移植到成熟卵母细胞中, 并测定该重构胚细胞内钙含量变化, 结果表明, 受精 1-和 2-细胞期的细胞核具有诱导成熟卵子钙释放活性的功能, 而 4-和 8-细胞期细胞核、融合的 2 或 3 个 4-细胞期的细胞核及乙醇孤雌活化的原核均不具有这种能力. 结果说明, 胚胎细胞核诱导卵子细胞内钙升高的能力是受精过程中产生的, 是受精胚特有的, 它存在于早期受精胚的特殊发育阶段. 这暗示早期受精胚这一特有的能力对胚胎的正常发育具有重要意义.

关键词 细胞核移植 Ca^{2+} 释放活性 受精胚

哺乳动物的卵子成熟后休止于第二次减数分裂的中期(metaphase II, 简称 M II). 当受精时, M II 卵母细胞胞质内游离钙离子的浓度($[\text{Ca}^{2+}]_i$)表现出周期性升高特征, 称为钙振荡(calcium oscillation)^[1]. 这种现象见于目前所检测的所有哺乳动物, 如仓鼠^[2,3]、小鼠^[4]、猪^[5]以及牛^[6]等. 采用离子载体或显微注射的方法升高胞内钙离子的浓度, 可激活卵子, 并启动受精胚的发育^[7]. 但是到目前为止, 钙振荡的发生机理仍不清楚. 一种假说认为, 受精过程中, 精子与卵表面的受体相结合, 激活了与受体相耦联的 G-蛋白或酪氨酸激酶, 进一步活化了磷脂酶 C(PLC), 活化的 PLC 水解 4,5-二磷酸肌醇(PIP_2)产生了二脂酰甘油(DAG)和三磷酸肌醇(InsP_3), InsP_3 与胞内钙库——细胞内质网(ER)上的 InsP_3 受体结合, 诱导了 ER 内钙离子的释放^[8]; 另一种假说认为, 精卵融合过程中, 精子向卵子内释放了一种可溶性因子, 刺激了卵子内钙离子的释放^[9]. 英国学者发现了一种有趣的现象^[10]: 小鼠 1-和 2-细胞期受精胚细胞核移植到成熟卵母细胞, 可诱导卵母细胞发生钙离子升高, 并激活卵子; 而 4-细胞期受精胚细胞核和乙醇孤雌活化的原核胚则不具有这种能力. 然而, 早期受精胚细胞为何具有这样的活性? 其诱导成熟卵母细胞发生钙离子升高的机理是什么? 它所具有的诱导钙释放的能力是否随着胚胎分裂、卵裂球体积减小而衰退消失?

这些问题目前尚不清楚. 本研究通过对早期受精胚细胞核诱导成熟卵母细胞 Ca^{2+} 释放活性的探讨, 发现仅受精的 1-和 2-细胞期胚具有诱导 Ca^{2+} 释放的能力. 这可能暗示早期受精胚的这种诱导 Ca^{2+} 释放的能力对正常胚胎发育具有重要意义.

1 材料与方法

(i) 材料. 实验动物为本所动物室繁殖饲养的昆明白小鼠. 试剂除特殊说明者外均购自美国 Sigma 公司.

(ii) 受体小鼠成熟卵母细胞(简称 M II 卵)的获得. M II 卵采取超数排卵方法获取. 每只昆明白小鼠(4~6 周龄)腹腔内注射 7.5 IU 孕马血清促性腺激素(PMSG, 天津激素制品厂), 46 ~ 48 h 后再经腹腔注射 7.5 IU 人绒毛膜促性腺激素(hCG, 宁波激素制品厂). 14 ~ 15 h 后, 断颈处死小鼠, 取出输卵管, 放入 M2^[11]溶液中, 撕开输卵管壶腹膨大部释放出卵丘细胞-卵母细胞复合体, 并将其转入到含 0.3%透明脂酸酶的 M2 液中约 3 ~ 5 min, 使卵母细胞与卵丘细胞分离. 然后, 将卵母细胞转入到含有 6 ~ 7 $\mu\text{g/mL}$ 细胞松弛素 B(简称 CB)的 M2 液中, 置于 37℃ 恒温箱内备用.

(iii) 供体不同发育阶段胚胎的获得. 超数排卵处理(方法同上)的小鼠于注射 hCG 后立即与雄性小鼠合笼, 次日早晨检查阴栓. 见阴栓者取出单独饲养

备用。然后，分别于注射 hCG 21 ~ 22, 44 ~ 45, 43 ~ 55 及 70 ~ 72 h 后断颈处死小鼠，收集原核期和 2-, 4-, 8-细胞期胚胎，将 4-和 8-细胞期胚放入酸性台氏液^[11]中数秒以除去透明带。去带后的胚分裂球细胞团在 M2 液中洗 5 ~ 6 次，然后放入 0.5%胰酶^[11]中消化，分散开的单个分裂球细胞放入 M2 液中洗干净，转入含 6 ~ 7 $\mu\text{g/mL}$ CB 的 M2 液中，置于 37℃ 恒温箱内备用。

(iv) 供体乙醇孤雌活化原核胚的获得。M II 卵取自注射 hCG 后 15 ~ 16 h 的超排小鼠，放入含 7% 乙醇的 M2 液中，于室温孵育 5 ~ 6 min 取出，用 M2 液洗 5 ~ 6 次，转入 M16^[11]培养液中，在 37℃, 5%CO₂ 的培养箱内培养，观察活化及发育情况。原核通常于乙醇刺激后 5 ~ 6 h 开始形成。选择发育到原核期的胚胎用于细胞核移植实验。

(v) 供体 4-细胞期胚细胞融合合胞体的获得。将注射 hCG 后 53 ~ 54 h 收集的 4-细胞期胚用 0.3 mol/L 甘露醇液(0.3 mol/L 甘露醇, 10 $\mu\text{mol/L}$ CaCl₂, 10 $\mu\text{mol/L}$ MgCl₂)洗 3 ~ 5 次，以电刺激方法进行融合处理(方法及参数见(vii))。经电融合后可获得由 4, 3 及 2 个细胞核构成的融合胚，将其放入含 6 ~ 7 $\mu\text{g/mL}$ CB 的 M2 液中，置于 37℃ 恒温箱内备用。

(vi) 显微操作方法。供体及受体细胞放入 M2 液滴(约 200 μL ，其上覆盖石蜡油)中，在 Leitz 显微操作仪上进行显微操作。全部操作在室温下进行。具体步骤按 McGrath 和 Solter^[12]的方法进行。M II 卵用作受体，原核，2-, 4-和 8-细胞胚，4-细胞融合胚以及乙醇孤雌激活原核胚用作供体。首先分别吸取原核胚细胞质和细胞核，2-细胞胚细胞质，2-,4-及 8-细胞胚分裂球的细胞核，乙醇孤雌活化原核胚细胞核以及融合胚细胞核(2 或 3 个)，移植到 M II 卵周隙内。然后，将核移植胚转入到 M16 液中，放于 37℃, 5%CO₂ 的培养箱内直至进一步处理。

(vii) 细胞融合。细胞融合按 Sun 和 Moor^[13,14]所述方法进行。融合仪为 BTX-200(BTX, San Diego, CA)，融合槽内两圆形电极之间距离为 0.5 mm，融合液为不含 Ca²⁺和 Mg²⁺的 0.3 mol/L 甘露醇。融合参数：交流电(AC)1.2 ~ 1.5 V，持续时间为 5 ~ 8 s；直流电(DC)1.4 kV/cm，脉冲宽度为 70 μs ，脉冲次数 2 次。两次直流脉冲之间的时间间隔为 1 s。电融合处理后的胚胎转移到 M2 液中，置于 37℃ 培养箱内使其融合。

融合一般发生在电击后的 20 ~ 40 min 内。

(viii) 细胞内游离钙离子(Ca²⁺)浓度的测定。电击前，细胞移核胚放入含 4 $\mu\text{mol/L}$ 的 Furo-2/AM (Molecular Probe Inc. USA)的 M2 液中 37℃ 孵育 30 min。电击后，融合的重构胚立即放入预热至 37℃ 的 M2 液中，在荧光检测系统 Applied Image System (Life Science Co. Cambridge, UK)中检测细胞内钙离子变化。检测时间为 2 h。

2 结果

为了检测不同发育时期胚胎细胞核和胞质是否都有[Ca²⁺]_i 释放活性，我们将其分别移植到 M II 卵内，获得重构胚。然后检测重构胚胞内[Ca²⁺]_i 的变化。第一次[Ca²⁺]_i 升高发生在膜融合后 15 min 内。结果显示(表 1)，48 枚受精卵原核重构胚中有 41 枚表现 1 ~ 4 次[Ca²⁺]_i 升高变化，占重构胚的 85%。钙峰峰高平均值为(609.25 ± 33.59) nmol/L，峰宽(钙峰持续时间)为(158.77 ± 24.78) s(图 1(a))。对照组中，原核胚细胞质与 M II 卵构成的重构胚 24 枚，只有 3 枚检测到[Ca²⁺]_i 升高(图 1(b))，占重构胚的 12%，钙峰峰高平均值为(321.34 ± 56.98) nmol/L，峰宽为(132.43 ± 23.34) s，其钙峰峰值明显低于原核重构胚(P > 0.05)。

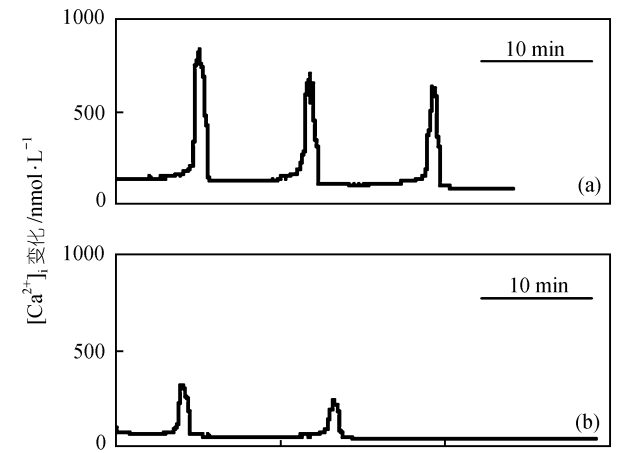


图 1 受精卵原核与细胞质分别移植到 M II 卵母细胞中诱导的[Ca²⁺]_i 变化
(a) 原核诱导的钙离子升高; (b) 细胞质诱导的钙离子升高

7 枚 2-细胞期细胞核移植重构胚中有 5 枚检测到[Ca²⁺]_i 升高，占重构胚的 71%，钙峰峰高平均值为(278.61 ± 81.46) nmol/L，峰宽为(146.60 ± 45.60) s(图 2(a))。2-细胞期细胞质移植重构胚 25 枚，4-细胞期及 8-细胞期胚胎分裂球细胞核移植胚分别为 6 枚，均未

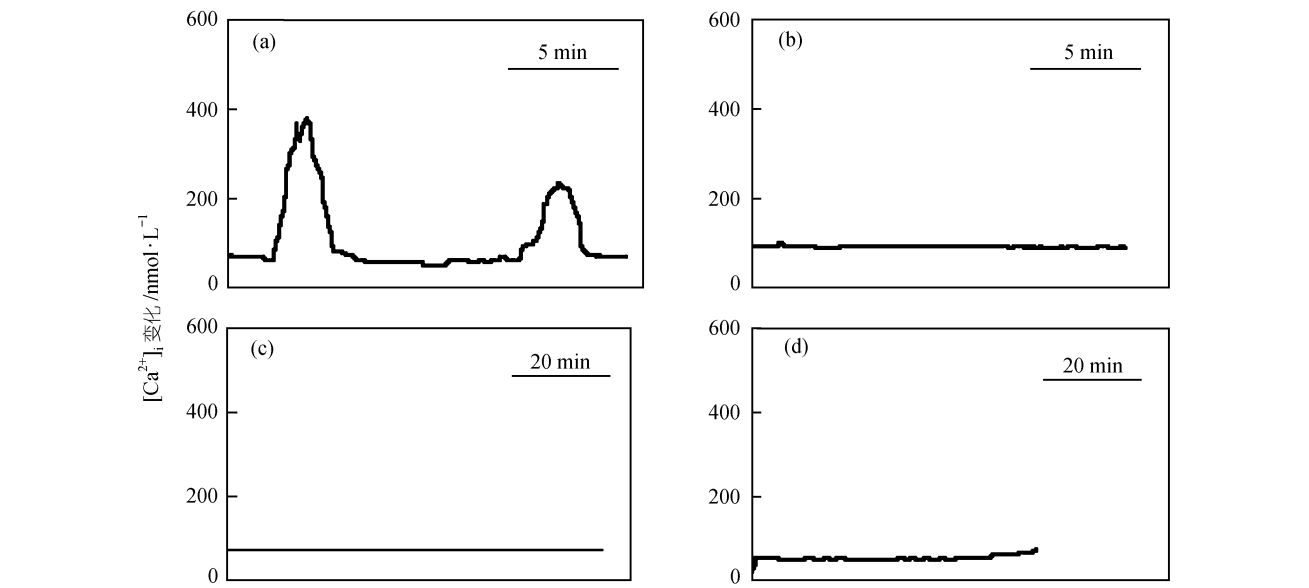


图 2 2-, 4-和 8-细胞期细胞核及乙醇孤雌活化原核胚细胞核移植到 M II 卵后引起的[Ca²⁺]_i变化
(a) 2-细胞期细胞核移植到 M II 卵后引起的[Ca²⁺]_i升高; (b)~(d) 分别为 4-及 8-细胞期细胞核和乙醇孤雌活化原核胚细胞核移植到 M II 卵后引起[Ca²⁺]_i变化情况, 它们均不能引起[Ca²⁺]_i升高

供体	受精卵原核	受精卵胞质	2-细胞期 细胞核	2-细胞 期细胞质	4-细胞 期细胞核	4-细胞期胚胎融合胚		8-细胞期 细胞核	乙醇孤雌 激活原核
						2 个 细胞核	3 个 细胞核		
重构胚数量/个	48	24	7	25	6	6	7	6	7
表现[Ca ²⁺] _i 升高的重 构胚数	41(85%)	3(12%)	5(71%)	0	0	0	0	0	0
钙峰平均值/nmol · L ⁻¹	609.25 ± 33.59	321.34 ± 56.98	278.61 ± 81.46	—	—	—	—	—	—
钙峰平均持续时间/s	158.77 ± 24.78	132.43 ± 23.34	146.60 ± 45.60	—	—	—	—	—	—

a) 表中峰高、峰宽值以平均值 ± 标准差表示

能检测到[Ca²⁺]_i升高(图 2(b)及(c)). 此外, 我们还检测了 7 枚乙醇孤雌活化原核移植重构胚, 也未能检测到[Ca²⁺]_i升高变化(图 2(d)).

上述结果表明, 受精早期胚胎细胞核移植到 M II 卵表现出的诱导胞内[Ca²⁺]_i升高的活性, 仅为受精 1-和 2-细胞期细胞核特有.

为了证实在 4-和 8-细胞期细胞核移植重构胚中未能检测到[Ca²⁺]_i变化是因为随着细胞的分裂, 细胞体积减小, 其活性减弱所致, 我们利用电融合方法, 制备由 4, 3 及 2 个 4-细胞期胚胎分裂球细胞融合而成的融合胚, 然后将融合胚中的 2 或 3 个细胞核同时移植到 M II 卵中, 得到 3 个细胞核移植重构胚和 2 个细胞核移植重构胚各 6 枚, 但这些重构胚均未出现可检测到的[Ca²⁺]_i升高变化(图 3). 说明 4-细胞期以后的细胞核确实丧失了诱导卵子 Ca²⁺释放活性的

能力.

3 讨论

本研究通过将受精原核、2-细胞期细胞核移植到 M II 卵母细胞中, 发现它们均能诱导卵子释放 Ca²⁺, 而乙醇孤雌活化胚的原核则不具有这种活性. 这一结果与 Kono 等人^[10]的报道一致. 这表明受精原核及 2-细胞期细胞核具有的诱导成熟卵子 Ca²⁺释放能力与受精有关. 此外, 我们将 4-和 8-细胞期细胞核移植到 M II 卵中, 发现它们不能诱导卵子发生 Ca²⁺升高, 表明这种功能只为原核和 2-细胞期细胞核具有.

Kono 等人^[10]的研究表明, 4-细胞期细胞核移植到 M II 卵中不能诱导卵子产生 Ca²⁺升高. 随着 2-细胞期胚胎分裂成为 4-细胞胚, 胚胎内的细胞核由原来的 2 个增加到 4 个. 细胞数目增加了, 而每个胚胎卵裂球的

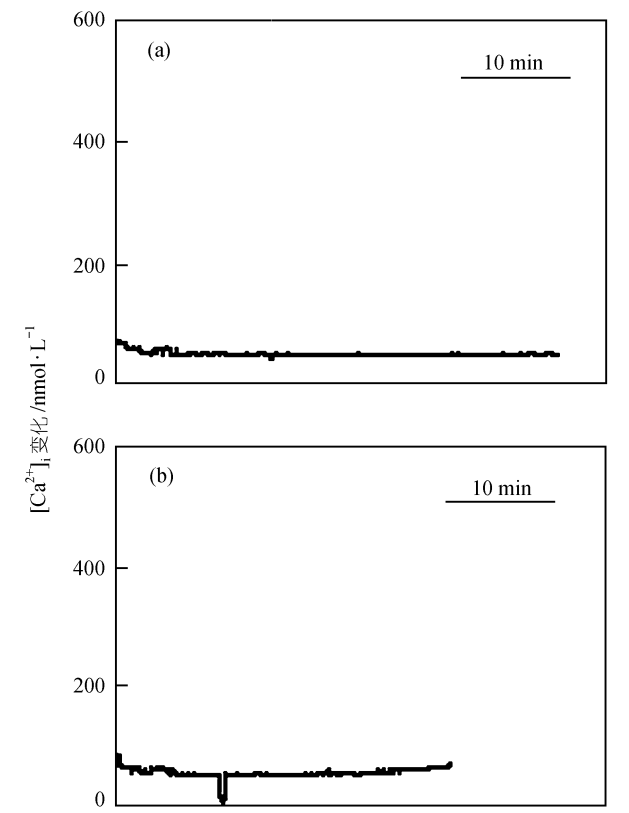


图 3 4-细胞期胚胎卵裂球融合后的细胞核移植到 M II 卵子中不能诱导 $[Ca^{2+}]_i$ 升高
(a) 3 个细胞核同时移植到 M II 卵中; (b) 2 个细胞核同时移植到 M II 卵中

体积却减小了。在这一发育过程中,是否由于胚胎细胞体积的减小或细胞核数目增多而减弱了诱导卵子 Ca^{2+} 释放的活性?为此,我们将融合后的 4-细胞期合胞体胚的 2 或 3 个细胞核同时移植到 M II 卵内,也未能诱导卵子产生 Ca^{2+} 升高。这表明,4-细胞期细胞核不再具有这种活性,不是由于细胞数目增多,活性被减弱或稀释的结果,而是由于受精胚发育到此时期时丧失了该能力所致。

受精早期胚胎细胞核如何具有这种活性,我们认为主要有 2 种可能。第一,在受精过程中,精子释放到卵子中的精子激活因子在早期胚胎发育过程中与细胞核结合在一起。精子提取物激活发育的孤雌原核期细胞核能诱导 M II 卵 Ca^{2+} 释放活性,注入精子提取物的小鼠卵母细胞与 M II 卵融合后也能产生 Ca^{2+} 释放活性,而乙醇孤雌激活或 Sr^{2+} 激活的胚胎细胞核则不具备这种能力^[10,15]。这些证据表明早期胚胎细胞核具有的诱导成熟卵母细胞产生 Ca^{2+} 释放的能力与来源于精子中的精子激活因子有关。以前的

研究表明,在受精前,活化的精子因子与精子核膜相连,核膜可能起稳定这种因子并调节它释放到胞浆中的作用^[16,17]。第二,受精过程中,精子在激活卵子时产生了某种因子,这种因子结合到了早期胚胎细胞核上。当细胞核被移植到成熟卵内后,这种因子重又表现出了诱导卵子 Ca^{2+} 释放活性。这种因子可能位于细胞核内,也可能存在于核周围区域内,或与核膜结合在一起。目前,这些问题尚不清楚。

本研究发现,部分受精原核胚的胞质移植到 M II 卵内也能诱导卵子 Ca^{2+} 释放,但钙升高的峰值比细胞核诱导的要低。这可能是因为这种诱导卵子 Ca^{2+} 释放的活性尚未完全从这些细胞胞质转移到细胞核内,部分活性仍残留在胞质内。这与本实验室观察到这种活性具有从胞质→原核→胞质(1-细胞期核膜破裂后)→细胞核(2-细胞期)→消失(4-细胞期)的定位变化特征(结果未发表)是相吻合的。Ogonuki 等人^[18]用猴精子细胞与小鼠成熟卵母细胞融合后发育到原核期的胞质能诱导卵子产生 Ca^{2+} 释放的实验证据也支持本实验推论,但他们没有测定胞内 Ca^{2+} 升高变化。

综上所述,我们认为,受精胚具有的诱导成熟卵母细胞 Ca^{2+} 释放的活性是在受精过程中诱导产生的,活性存在的时间依赖于胚胎细胞的发育阶段,仅为受精原核和 2-细胞期细胞核特有。这一活性存在的意义以及它的作用机理、信号传导通路和作用的靶基因等有待进一步研究。

致谢 本工作为国家重点基础研究发展规划(批准号: G1999055902)、中国科学院“九五”重大项目(批准号: KJ951-B1-607)和中国科学院生物特支费(批准号: STZ-00-15)资助项目。

参 考 文 献

- 1 Miyazaki S, Shirakawa H, Nakada K, et al. Essential role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/ Ca^{2+} release channel in Ca^{2+} waves and Ca^{2+} oscillations at fertilization of mammalian eggs. *Dev Biol*, 1993, 158: 62~78
- 2 Miyazaki S, Igusa Y. Fertilization potential of golden hamster eggs consists of recurring hyperpolarizations. *Nature*, 1981, 290: 702~704
- 3 Miyazaki S, Igusa Y. Ca^{2+} -mediated activation of a K^+ current at fertilization of golden hamster eggs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, 79: 931~935
- 4 Kline D, Kliue J T. Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. *Dev Biol*, 1992, 149: 80~89
- 5 Sun F Z, Hoyland J, Huang X, et al. A comparison of intracellular changes in porcine eggs after fertilization and electroactivation. *Development*, 1992, 115: 947~956

- 6 Fissore R A, Dobrinski J R, Duby R T, et al. Patterns of intracellular Ca^{2+} concentrations in fertilized bovine eggs. *Biol Reprod*, 1992, 47: 960~969
- 7 Nuccitelli R. How do sperm activate eggs? *Curr Topics Dev Biol*, 1991, 25: 1~17
- 8 Miyazaki S. Inositol 1,4,5-triphosphate-induced calcium release and guanine nucleotide-binding protein-mediated calcium rises in golden hamster eggs. *J Cell Biol*, 1988, 106: 345~353
- 9 Swann K. A cytosolic sperm factor stimulates repetitive calcium increases and mimics fertilization in hamster eggs. *Development*, 1990, 110: 1295~1302
- 10 Kono T, Carroll J, Swann K, et al. Nuclei from fertilized mouse embryos have calcium-releasing activity. *Development*, 1995, 121: 1123~1128
- 11 Hogan B, Costantini F, Lacy E. *Manipulating the Mouse Embryos. A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1986. 250
- 12 McGrath J, Solter D. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science*, 1983, 220: 1300~1302
- 13 Sun F Z, Moor R M. Factors controlling the electrofusion of murine embryonic cells. *Bioelectrochem Bioenerg*, 1989, 21: 149~160
- 14 Sun F Z, Moor R M. Nuclear-cytoplasm interactions during ovine oocyte maturation. *Development*, 1991, 111: 171~180
- 15 Gordo A C, Kurokawa M, Wu H, et al. Modifications of the Ca^{2+} release mechanisms of mouse oocytes by fertilization and by sperm factor. *Mol Hum Reprod*, 2002, 8(7): 619~629
- 16 Kimura Y, Yanagimachi R, Kuretake S, et al. Analysis of mouse oocyte activation suggests the involvement of sperm perinuclear material. *Biol Reprod*, 1998, 58: 1407~1415
- 17 Perry A C F, Wakayama T, Yanagimachi R. A novel *trans*-complementation assay suggests full mammalian oocyte activation is coordinately initiated by multiple, submembrane sperm components. *Biol Reprod*, 1999, 60: 747~755
- 18 Ogonuki N, Sankai T, Yagami K, et al. Activity of a sperm-borne oocyte-activating factor in spermatozoa and spermatogenic cells from cynomolgus monkeys and its localization after oocyte activation. *Biol Reprod*, 2001, 65(2): 351~357

(2002-05-16 收稿, 2002-08-12 收修改稿)