of monopolar spindles. Cell, 1995, 81: 95~ 105
9 Yanai A, Arama E, Kilfin G, et al. Aykl, a novel mammalian gene related to Drosophila aurora centrosome separation kinase, is specifically expressed during meiosis. Oncogene, 1997, 14: 2 943~ 2 950
10 Kimura M, Kotani S, Hattori T, et al. Cell cycle_dependent expression and spindle pole localization of a novel human protein kinase, Aik, related to Aurora of Drosophila and yeast Ipll. J Biol Chem, 1997, 272(21): 13 766~ 13 771

(1998-06-24 收稿, 1998-10-06 收修改稿)

核质比对家兔胚胎发育的影响

周 琪㈣ 李子义 谭景和 文兴豪④ 孙兴参
刘宗华 贺桂馨 李德雪④
(东北农业大学, 哈尔滨 150030; ④解放军农牧大学, 长春 130062;
㈣中国科学院发育生物学研究所, 北京 100080)

摘要 通过显微操作和电融合方法人为改变原核期胚胎的核质比, 比较异常核质比胚胎发育与正常胚胎发育的异同. 结果表明: 改变(增加或减少)原核期胚胎的核质比会使胚胎发育出现异常; 虽然发育到囊胚的比例与正常胚胎无显著差异($P > 0.05$), 而且囊胚形成的时间相似, 但具有异常核质比的胚胎发育到囊胚时的细胞数较正常胚胎的细胞数少.

关键词 家兔 胚胎发育 显微操作 核质比

哺乳动物细胞核移植是指将动物胚胎细胞核或体细胞核移植入去核的卵母细胞, 并使其发育的技术. 核移植技术对于动物繁殖和发育机理的研究有重要的意义. 尽管哺乳动物细胞核移植在多种动物都已获得成功[1], 但由于其影响因素复杂, 目前成功率仍很低. 在这些影响核移植成功率的因素中, 除细胞核全能性、核质相互作用等因素外, 移核胚核质比与其发育关系的研究开展得较少. 在核移植重组胚的制备过程中, 显微操作将会造成核质比的异常. 正常核质比改变后, 胚胎的发育会受到何种影响尚需探讨. 本实验以兔原核期胚胎及 2-细胞胚胎为材料, 研究了核质比与兔胚发育的关系.

1 材料与方法

(1) 动物的超数排卵与胚胎的收集. 6~ 12 月龄的母兔肌肉注射孕马血清促性腺素(PMSG)后, 间隔 72 h 静脉注射绒毛膜促性腺素(hCG), 同时与同种公兔交配; 分别于注射 hCG 后 20, 24 h 手术冲洗兔输卵管收集原核期及 2-细胞胚胎.

(2) 电融合. 用细胞电融合仪(中国科学院发育生物学研究所制, Kefa CE-450 型) 使兔 2-细胞胚胎进行融合, 条件为 1 次电场强度 0.45 kV/cm, 持续时间 640 μs 的直流电脉冲, 使之成为 1 个完整的细胞.

(3) 显微操作. ( ) 增加核质比(胞质减少组). 原核期胚胎在含 7.5 μg/mL 细胞松弛素 B(CB)的显微操作液中培养 15 min 后, 用固定管吸住胚胎靠近原核一侧的透明带, 将注射管刺入卵周隙, 管口轻轻抵在质膜上. 用去核管在无核的胞质部分去除约 1/3 的胞质. 将去核管中去除的胞质完整地吹出, 形成一个有质膜包被的胞质泡, 并从固定管口上释放已去除了部分胞质的胚胎, 这些胚胎为增加核质比的胚胎. ( ) 减小核质比(胞质相对增加组).

经电脉冲诱导融合后, 2-细胞胚胎形成 1 个完整的细胞, 原 2-细胞的 2 个卵裂球中的细胞核在融合后为 2 个独立的细胞核. 胚胎在含 CB(7. 5 μg/ mL) 的显微操作液中培养 15 min 后, 用固定管吸住融合胚胎, 使胞质多的一侧朝向固定吸管. 将注射管轻轻刺入透明带, 使注射管口抵在细胞核上方的质膜上, 可以选胞质中 2 个核中的任何 1 个. 轻轻下压, 转动注射器, 将细胞核吸入注射管中, 缓缓外拉, 将注射管连同管中带有少量胞质的细胞核一同撤出, 使胚胎细胞与去除的核分为 2 个部分. 从固定管上放下已去除了 1 个核的融合胚, 该胚胎胞质相对增加, 为减小核质比的胚胎. 再小心地将去核管中去除的胚胎细胞核放出, 这个细胞核外面带有少量的胞质, 我们称之为核体. 核体由 2-细胞胚胎的 1 个核和很少量的胞质组成, 是人为造成的核质比很大的一种细胞.

(4) 胚胎体外培养. 经显微操作改变了核质比的胚胎及显微操作中形成的胞质泡及核体培养于含 10% 小牛血清的 199 培养液微滴中, 置于 38. 5 ℃, 5% CO_2 的培养箱中培养, 每隔 24~ 48 h 换液. 正常体内受精原核胚在同样条件下培养作为对照, 定时观察记录.

(5) 胚胎细胞数的测定. 增加和减少核质比的胚胎及对照组胚胎经低渗处理和在醋酸酒精(1∶ 3) 固定液中固定后, 制备压片, 用地衣红染色, 在相差显微镜下观察, 进行细胞计数.

(6) 数据分析. 试验数据用百分数 t 检验的方法进行统计学处理.

2　结果

经显微操作改变(增加和减小) 正常核质比后, 胚胎发育明显变慢, 早期卵裂周期较正常胚胎延长. 但在正常胚胎形成囊胚时, 改变核质比的胚胎也形成囊胚. 改变核质比的囊胚发育率虽有所下降, 加大核质比的胚胎发育到囊胚的比例为 71. 43%, 减小核质比的发育率为 56. 25%, 而对照组正常胚胎的发育率为 82. 35%, 但统计学分析证明差异不显著($P > 0.05$) (表 1) . 增加核质比的胚胎可发育至囊胚期, 而同时在去核时得到的无核胞质泡不能进一步发育. 在制备减小核质比胚胎过程中形成的核体, 是带有很少胞质的 2-细胞核, 属于有较高核质比的细胞, 在培养液中也可发育, 但发育多停止在 2 或 3 个细胞, 并最终退化.

表 1　不同核质比胚胎的发育

核质比	重复次数	胚胎总数	发育胚胎数(%) *		
			2_细胞	8~ 16_细胞	桑椹胚与囊胚
正常(1∶ 1)	5	17	17(100. 00) [a]	15(88. 24) [b]	14(82. 35) [c]
增加核质比(3∶ 2)	5	21	21(100. 00) [a]	18(85. 71) [b]	15(71. 43) [c]
减小核质比(3∶ 5)	3	16	14(87. 50) [a]	12(75. 00) [b]	9(56. 25) [c]

* 相同字母代表差异不显著($P > 0.05$) , 不同字母代表差异显著($P < 0.05$)

核质比改变后, 胚胎发育时间和发育率在各组间无显著差异, 但发育到囊胚时的细胞数不同, 正常胚胎组显著多于核质比异常组($P < 0.05$) (表 2) .

表 2　不同核质比胚胎发育到囊胚时细胞数的比较

核质比	观察囊胚数	囊胚细胞数 ($\bar{X} \pm SE$) *
正常(1∶ 1)	10	119. 34 ±7. 21[a]
增加核质比(3∶ 2)	12	76. 67 ±10. 38[b]
减小核质比(3∶ 5)	8	81. 11 ±8. 14[b]

* 同表 1 注

3 讨论

在哺乳动物胚胎细胞核移植的研究中发现, 核移植胚胎发育率大大低于正常胚胎. 除细胞核全能性、核质相容性等原因外, 在核移植的去核过程中, 因去除部分胞质造成核质比的改变是否对胚胎的发育也有影响尚不清楚, 而核质比与胚胎发育有什么关系也是我们想要回答的问题.

我们用显微操作结合电融合方法, 人为地增加和减小核质比, 对核质比与胚胎发育的关系进行了研究. 结果表明, 利用显微操作加大核质比后, 胚胎的发育与正常胚胎相比, 在形成囊胚的时间和比例上无显著差异, 但囊胚的细胞数目明显减少. 2-细胞胚去核过程中形成的核体, 周围仅带有极少的胞质, 其核质比与正常胚胎细胞相比显著增加. 我们观察到, 这种核体最多只分裂 2 次, 形成 3-细胞胚, 并且最终停止发育而死亡. 通过把 2-细胞胚胎融合后再去 1 个核的方法得到的减小核质比的胚胎, 其囊胚的细胞数目也明显减少, 但囊胚发育时间及发育率与对照无显著差异.

核质比改变后影响胚胎发育的机理尚不清楚, 但卵母细胞内母源 mRNA 的量很可能是影响异常核质比胚胎发育的一个原因. 改变细胞质的量后, 胞质内 mRNA 的量也相应改变. 在早期胚胎发育中, 母体合子转折(maternal-zygote transition, MZT) 是一重要事件, 在 MZT 之前, 胚胎自身的基因尚未表达, 胚胎的发育是靠卵母细胞内的母源 mRNA 控制的; 在 MZT 之后, 胚胎的发育由母源 mRNA 指导转变为由自身产生的 mRNA 来控制. 兔胚胎 MZT 发生在 8-细胞期[2]. 在改变核质比后, 母源 mRNA 的量发生改变, MZT 的转换可能因而受到影响, 致使胚胎发育受到影响. 而且在发育到 8-细胞以后, 胚胎基因开始表达. 基因的表达是受反馈调节的, 胞质量改变后, 对基因转录的反馈控制的程度也必然要发生改变, 这就可能使基因过早发生表达或表达不充分而影响到胚胎发育.

通过人为改变胚胎细胞的核质比发现, 核质比对胚胎发育有显著的影响. 这主要表现在影响胚胎的卵裂, 虽然核质比异常胚胎发育到囊胚的时间和发育率与对照组无显著差异, 但囊胚细胞数变少. 这一结果提示, 在细胞核移植的操作中应控制核质比的变化, 以尽可能减少对移核胚发育的影响.

致谢 本工作为国家教委跨世纪优秀人才基金(批准号: 94004)、霍英东青年教师基金(批准号: 90052) 和黑龙江省杰出青年科学基金(批准号: 9502) 资助项目.

参 考 文 献

1 Willadsen S M. Nuclear transplantation in sheep embryos. Nature, 1986, 320(1): 63~65

2 Manes C. Nucleic acid synthesis in preimplantation rabbit embryo. a "dark period" immediately following fertilization and the early predominance of low molecular weight RNA synthesis. J Exp Zool, 1977, 201(2): 247~258

(1998-06-18 收稿, 1998-09-15 收修改稿)