





原创性声明

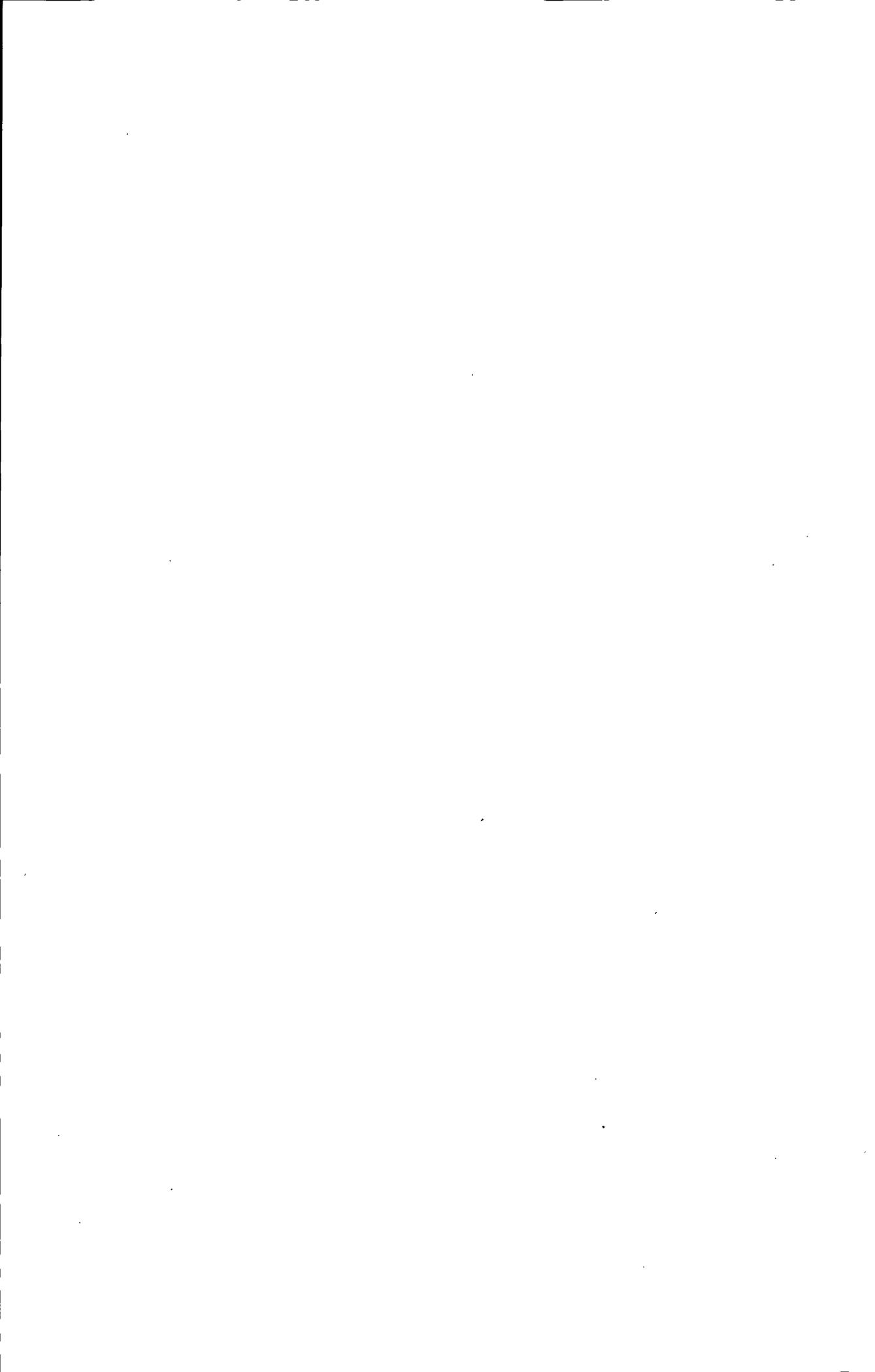
本人声明：所呈交的学位论文是本人在导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。除本文已经注明引用的内容外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得内蒙古大学及其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名：白春玲 指导教师签名：
日 期：2011.6.8 日 期：2011.6.8

在学期间研究成果使用承诺书

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，即：内蒙古大学有权将学位论文的全部内容或部分保留并向国家有关机构、部门送交学位论文的复印件和磁盘，允许编入有关数据库进行检索，也可以采用影印、缩印或其他复制手段保存、汇编学位论文。为保护学院和导师的知识产权，作者在学期间取得的研究成果属于内蒙古大学。作者今后使用涉及在学期间主要研究内容或研究成果，须征得内蒙古大学就读期间导师的同意；若用于发表论文，版权单位必须署名为内蒙古大学方可投稿或公开发表。

学位论文作者签名：白春玲 指导教师签名：
日 期：2011.6.8 日 期：2011.6.8



牛孤雌多倍体胚胎与克隆多倍体胚胎的研究

摘要

在哺乳动物中,体细胞克隆胚胎能够发育成个体的成功率一直很低。即使能够发育到妊娠后期,也往往出现胎儿巨大、胎盘异常等现象,从而影响克隆动物生产效率。多倍体细胞主要参与胎盘等胚外组织的形成,将多倍体胚胎与克隆胚胎聚合为一体进行移植,可以改善胎盘异常等引起的效率低下现象。因此,多倍体胚胎的研究对于进一步了解克隆动物发育机理具有重要意义。本研究采用免疫荧光染色、药物处理、孤雌激活、反向核移植等技术,研究了获得孤雌多倍体胚胎与克隆多倍体胚胎的技术途径、分析了卵母细胞核的存在对体细胞核重编程的影响,以便为进一步完善体细胞克隆技术提供实验依据。

1、牛、山羊、绵羊卵母细胞体外成熟过程中细胞核和细胞骨架的动态学变化

在牛、山羊、绵羊卵母细胞体外成熟过程中,收集成熟不同时间的细胞,通过对纺锤体微管、微丝和染色体的免疫荧光染色,分析了在整个体外成熟过程中细胞核的成熟进程以及细胞骨架和染色体的动态变化。结果显示:牛和山羊卵母细胞在成熟培养后的4h开始发生GVBD,12h即有50%-60%的卵母细胞到达MI期,16h到达AI/TI期峰值(42%),20h后牛和山羊分别有66%和84%的卵母细胞进入MII期;绵羊卵母细胞核成熟进程略慢于牛和山羊,GVBD发生的时间也是成熟培养后的4h,但达AI/TI期峰值的时间和发育为MII期的时间分别为20h(50%)和24h(76.5%),均晚于牛和山羊;卵母细胞在体外成熟过程中,其细胞骨架和染色体动态变化在三种动物基本相似,在部分绵羊卵母细胞出现三级纺锤体等异常结构。

2、细胞松弛素 B (CB) 对牛卵母细胞减数分裂和二倍染色体卵母细胞形成的影响

将牛卵母细胞置入含有 CB 的培养液中培养后, 分别观察了 CB 的浓度和处理方法对卵母细胞发育的影响, 其结果是: (1) 培养时间 24h (全程处理), CB 浓度 $\geq 2.0 \mu\text{g/ml}$ 时, 卵母细胞的成熟率 $\leq 44.8\%$, 成熟卵母细胞的染色体单倍性组成比例 $\leq 73.9\%$, 两者均显著低于对照组的 83.1% 和 93.8%; 处理组有 50% 以上的卵母细胞未排出第一极体 (PB1), 其中的 50%-65% 染色体为 60 条, 呈二倍性; 处理的卵母细胞中出现纺锤体形态异常、两个纺锤体、60 条染色体组成超大纺锤体等现象。(2) 在培养时间 6-8h 分别添加 $7.5 \mu\text{g/ml}$ 和 $15 \mu\text{g/ml}$ 的 CB 预处理, 然后移到无 CB 的培养液中继续培养至 24h, 其结果卵母细胞的成熟率约为 80%, 与对照组的 83% 没有显著性差异, 将预处理时间延长到 10h 使成熟率显著降低 (60%)。(3) 在未处理培养液中培养 10h, 然后转移至含有 $3.0-7.5 \mu\text{g/mL}$ CB 的培养液中继续培养到 24h (后处理), 结果只有 41.5-7.2% 的卵母细胞排出 PB1, 其余 58.5-92.8% 没有排除 PB1。(4) 在无 CB 的培养液中培养 10h, 然后移至含有 $7.5 \mu\text{g/ml}$ CB 的培养液中分别培养至 24h、30h、36h、48h, 进行免疫荧光染色, 观察卵母细胞所处核相, 结果是 30h 以上处理组 AI/TI 期卵的比例为 1.9-6.4%, 显著低于 24h 处理组的 15.3%, 而多数为由 60 条染色体组成的巨大纺锤体细胞。

以上结果表明, CB 可能破坏纺锤体结构, 从而抑制 PB1 排出, 降低卵母细胞成熟率, 导致二倍染色体 (2n 或 4c) 卵母细胞的形成。

3、细胞松弛素 B (CB) 对牛四倍体孤雌胚胎发育的影响

将卵母细胞分为三个处理组: 一是 CB 浓度为 $0.1-10.0 \mu\text{g/ml}$, 培养时间 24h 的处理组 (全程处理组); 二是在含有 7.5 和 $15 \mu\text{g/ml}$ CB 的培养液中预培养 6-10h 后移至不加 CB 的培养液培养至 24h (预处理组); 三是用不加 CB 的培养液培养 10h 后转到含有 CB 的培养液中继续培养至 24h (后处理组)。然后对

三个处理组分别进行孤雌激活和发育培养,观察 CB 对四倍体孤雌胚胎发育的影响。结果是:(1)后处理组的四倍体孤雌胚囊胚发育率(25-28%)明显高于全处理组(5%-15%)、前处理组(7%-16%)和对照组(12%-16%)。(2)对后期处理组得到的孤雌胚胎进行染色体分析发现,来源于未排 PB1 的卵母细胞的胚胎中,有 74%的 1-细胞胚胎、82%的 2-细胞胚胎和 75%的囊胚是四倍体($4n=120$)。(3)对激活后 40h 未卵裂的卵母细胞进行染色体分析发现,有 15%以上含有超多倍数染色体,这说明在 40h 内发生了多次 DNA 复制。

以上结果表明,通过 CB 处理形成的二倍染色体($2n$ 或 $4c$)牛卵母细胞,能够发育为四倍体胚胎,且发育率很高。

4、卵母细胞核的存在对克隆胚胎供体核重编程和多倍体胚胎发育的影响

以未去核的 MII 期卵母细胞为胞质受体构建重构胚胎,检测了卵母细胞核的存在对供体细胞核重编程的影响,包括对早熟染色体凝集 (premature chromosome condensation, PCC)、染色体结构和重构胚发育的影响,在此基础上探索了以未去核卵母细胞构建的重构细胞能够发育为多倍体的可能性。研究结果显示:(1)受体细胞 MII 纺锤体的存在更容易诱发重构细胞中的供体细胞发生 PCC。(2)供体细胞核与受体细胞 MII 纺锤体之间的位置关系对第二极体 (PB2) 的排出有影响,当两者的纺锤体距离比较远时,94.4%的重构细胞能够排出 PB2;当两者的纺锤体位置接近时,几乎所有重构细胞都没有排出 PB2,大部分(67.9%)形成超大纺锤体,受体卵母细胞和供体细胞的染色体混为一体。(3)用去核卵母细胞构建的重构胚胎被激活后,其卵母细胞和供体核显示出多种原核形态,并且发育不同步。(4)上述重构胚经过发育培养后,以卵丘细胞为核供体时卵裂率和囊胚发育率分别为 81.9%和 22.3%,与对照组的 84.9%和 29.1%没有显著差异 ($p>0.05$);以成纤维细胞为核供体时卵裂率和囊胚发育率分别为 90.3%和 22.7%,与对照组的 81.9%和 31.1%也没有显著差异 ($p>0.05$);而囊胚孵化率则以卵丘细胞为供体时 0,以成纤维细胞为供

体时 27.5%，分别低于对照组的 23.1% ($p < 0.05$) 和 72.3% ($p < 0.05$)。(5) 以未去核卵母细胞为受体的重构囊胚其细胞由各种多倍体细胞混合而成，包括 $2n/4n$ 、 $2n/6n$ 、 $2n/8n$ 和 $2n/4n/8n$ ；并且这种来源的囊胚细胞数（约 60 个细胞）明显少于去核对照组的囊胚细胞数（约 90 个细胞）。(6) 通过反向核移植（reverse nuclear transfer, RNT）的方法研究结果显示：重构胚融合后 1h 去核组的囊胚发育率为 47.2%，显著高于 3h 去核组的 20%，（ $p < 0.01$ ）；重构胚融合 3h 后去核，使染色体构象出现异常。

以上结果表明，卵母细胞的 MII 纺锤体能够诱发供体细胞发生 PCC；以去核卵母细胞为受体构建的重构胚能够发育为囊胚期克隆胚，但其发育能力明显低于以去核卵母细胞为受体的重构胚，并且所有囊胚都是混合多倍体。

关键词：卵母细胞，核成熟进程，体细胞重编程，四倍体

STUDY ON BOVINE PARTHENOGENETIC AND CLONING POLYPLOID EMBRYOS

ABSTRACT

The efficiency of producing animals through somatic cell nuclear transfer (SCNT) in mammalian is still low. Even when fetuses develop to term, the phenomena such as large offspring and abnormal placenta development is often present, which affect animal cloning efficiency. Polyploid cells can give rise to extraembryonic tissues. Transfer of aggregated embryos of polyploid and cloned embryos can improve animal producing efficiency. Therefore, obtaining polyploid embryos is very important for further study on developmental mechanism of cloned animals. In this research, techniques such as immunofluorescent staining, drug treatment, parthenogenetic activation, reverse nuclear transfer were employed to study the methods of getting parthenogenetic and cloned polyploid embryos and to analyze the effect of bovine oocyte nuclear on somatic cell nuclear reprogramming. This research will provide experimental basis for perfection of SCNT technique.

1. Nuclear maturation process and dynamic changes of cytoskeleton and chromosome of oocytes from bovine, goat and ovine during in vitro maturation

In this experiment, the bovine, goat and sheep oocytes matured in vitro for different time were collected, respectively. The nuclear maturation process and dynamic changes of cytoskeleton and chromosome were analyzed by immunofluorescent staining. The nuclear maturation process of bovine and goat oocytes exhibited similar characteristics, with GVBD initiate 4h after beginning of maturation. 50%-60% of oocytes arrived at MI at 12h. Peak of AI/TI appeared at 16h (42%), then most of the oocytes begin to expel polar body and enter MII. Nuclear maturation process of sheep oocytes was slower than bovine and goat. The peak of AI/TI appeared at 20h after IVM. The dynamic changes of cytoskeleton and

chromosome of oocytes from three domestic animals were similar, but more irregular spindle structure tend to occur in sheep oocytes.

2. Effects of cytochalasin B on in vitro maturation of bovine oocytes and formation of diploid chromosome oocytes

This study was designed to investigate the effects of cytochalasin B (CB) on bovine oocyte maturation, and to induce the formation of diploid oocytes. The results showed that: (1) Incubation of oocytes in CB at $\geq 2.0 \mu\text{g/mL}$ concentrations for 24 h significantly decreased oocyte maturation and the matured oocytes' haploid composition. Over 50% of the CB-treated oocytes did not expel PB1 (non-PB1), and 50-65% of the non-PB1 oocytes contained $2n$ (60) chromosomes. (2) Pretreatment of oocytes with CB at concentrations of 7.5 and $15 \mu\text{g/mL}$ for 6-8h did not affect the maturation rates compared to the control oocytes (about 80% vs. 83%), but prolonged pretreating time to 10h significantly decreased the oocyte maturation(60%). (3) Oocytes were cultured for the first 10h and then transferred to 3.0-7.5 $\mu\text{g/mL}$ CB-containing medium and cultured to 24h (post-treatment). The results showed that 58.5%-92.8% of the oocytes could not expel PB1. (4) Prolonging the post-treatment of oocytes in CB at $7.5 \mu\text{g/mL}$ to 30h, 36h, and 48h, respectively resulted in significantly decreased AI/TI oocytes to 1.9-6.4% compared to 24h treatment group (15.3%) and increased the number of oocytes containing big spindles comprised of 60 chromosomes.

These results indicated that CB disfigures spindle structure, inhibits PB1 extrusion, decreases oocyte maturation, and results in formation of diploid ($2n$ or $4c$) oocytes.

3. Effect of Cytochalasin B treatment of bovine oocytes on tetraploid parthenogenetic embryo development

This study was designed to induce the formation of tetraploid embryos. The oocytes were matured in CB-containing media at different concentrations for 24h, or pretreated with CB for 6-10h then into normal culture media up to 24h, or

pre-culture in normal media for 10h then post-treatment of oocytes with CB to 24h. The results showed that: (1) The parthenogenetic blastocysts (25–28%) derived from the non-PB1 oocytes of posttreatment group was significantly higher than that from whole period treatment (5%-15%), pretreatment (7%-16%), and the control oocytes (12–16%). (2) Cytogenetic analysis of the embryos derived from CB-treated non-PB1 oocytes resulted in 74% of the one-cell stage embryos being $4n=120$ chromosomes, 82% of two-cell stage embryos contained $4n$ chromosomes in each blastomere, and 75% of the blastocysts were tetraploidy ($4n=120$). (3) The stopped uncleaved one-cell embryos showed an amazing phenomenon of over 15% of them containing extra chromosomes, which suggested multiple DNA duplication occurred within 40 h after activation.

In conclusion, CB treatment results in formation of diploid ($2n$ or $4c$) oocytes. The diploid oocytes resulted in a higher development of tetraploid embryos.

4. Effects of the presence of oocyte nuclei on the donor cell nuclear remodeling and polyploid embryo development

In this experiment, the non-enucleated oocytes were used as recipient to reconstruct embryos and examined the effects of the presence of oocyte nuclei on the donor cell nuclear remodeling, including premature chromosome condensation (PCC) and DNA configuration, and subsequent embryo development. The results showed that: (1) the presence of oocyte MII spindles was more likely to induce donor cell PCC. (2) The positional relationship between the fused donor cell and the oocyte metaphase spindle had an effect on oocyte PB2 extrusion. When the fused donor cell was widely separated from the MII spindle, 94.4% of the reconstructed oocytes expelled a PB2. When the donor cell was fused adjacently to the MII spindle, almost all of the reconstructed oocytes did not expel the PB2; the majority (67.9%) formed a very large M-phase spindle in which the oocyte and the donor cell chromosomes merged. (3) After activation, the oocyte and donor nuclei exhibited a variety of pronuclear patterns and asynchronous development. (4) The

embryos reconstituted with nonenucleated oocytes resulted in a similar cleavage rate as observed in the control embryos reconstituted with enucleated oocytes. Blastocyst developmental rates were no different between nonenucleated and enucleated cloned embryos; however, the development rates from early to hatching blastocysts significantly decreased in the nonenucleation group compared to enucleation controls (0 vs. 23.1%; 27.5 vs. 67.8%), regardless with either cumulus cells or fibroblasts as donor cells. (5) All nonenucleated oocyte-derived blastocysts contained mixed polyploidy with a variety of compositions that included $2n/4n$, $2n/6n$, $2n/8n$, and $2n/4n/8n$; The blastocyst cell number in the nonenucleated groups (about 60 cells) was significantly lower than the enucleated control groups (around 90 cells). (6) The in vitro developmental data of embryos produced by two reverse nuclear transfer protocols showed that development of the RNT-1h group was much higher than the RNT-3h group (47.2 vs. 20%, $p < 0.01$). The enucleation 3h after nuclear transfer induced abnormal DNA configuration.

We conclude that oocyte MII spindles induce donor cell PCC, the developmental capacity of cloned embryos reconstituted with nonenucleated oocytes is inferior to those with enucleated oocytes, and that all such derived blastocysts are polyploidy.

KEY WORDS: oocytes; nuclear maturation process; somatic cell reprogramming; tetraploidy

目 录

摘要.....	I
Abstract	V
目录	1
缩略词表	5
引言	7
第一章 文献综述：哺乳动物卵母细胞的不对称分裂与实验条件下的多倍体胚胎发生	13
一、哺乳动物卵母细胞的不对称分裂	13
1 不对称分裂	13
2. 卵母细胞的不对称分裂	14
2.1. 不对称分裂方式.....	14
2.2. 不对称分裂的功能性结果.....	14
2.3. 不对称分裂过程中的皮质重组.....	15
2.4. 卵子老化对不对称分裂的影响.....	15
3. 卵母细胞不对称形成的机制	16
3.1. 纺锤体迁移机制.....	16
3.2 皮质重组的机制.....	17
3.3. 参与不对称分裂的相关分子.....	18
二、微丝及其在卵母细胞不对称分裂过程中的作用.....	20
1. 微丝的生化特点	20
2. 肌动蛋白成核	20
3. 微丝动态变化的调节	22
4. 肌动蛋白骨架在细胞内的驱动作用机制	22
5. 微丝在卵母细胞减数分裂过程中对纺锤体迁移的作用	22
6. 微丝形成相关蛋白与卵母细胞纺锤体迁移	23
6.1 formin-2.....	23
6.2 myosin II	23
6.3 CDC42	24

7. 纺锤体旋转和极体的排出	24
三、Rho 家族蛋白与卵母细胞减数分裂	25
1 Rho 和 Ran 家族蛋白	25
2 卵母细胞中 Rho GTP 酶和 Ran GTP 酶的活性	27
3 在纺锤体形成和定位中的作用	27
4 皮质分化	28
5. 极体排放	29
四、多倍体胚胎的研究及应用	30
1 动物中的多倍体现象	30
2 四倍体胚胎的获得	31
2.1 细胞核移植法	31
2.2 抑制卵裂球分裂法	31
2.3 细胞融合法	31
3 四倍体胚胎的发育能力	32
4 小鼠四倍体胚胎的细胞学效应	32
5 四倍体胚胎的基因表达	33
6 四倍体发育异常的原因	33
7 四倍体胚胎的应用	33
五、卵母细胞极性与胚胎发育和体细胞重编程的关系	35
1 卵母细胞极性与胞质内精子注射 (ICSI)	35
2 卵母细胞极性与核移植	35
3 反向核移植	37
4 促进核重编程的原因	37
参考文献	39
第二章 牛、山羊、绵羊卵母细胞成熟过程中细胞核和细胞骨架的动态学变化	52
前言	52
1 材料与方法	53
2 结果	54
3 讨论	60
参考文献	63

第三章 CB 诱导牛二倍体卵母细胞形成	66
前言	66
1 材料与方法	66
2 结果	68
3 讨论	73
参考文献	75
第四章 CB 诱导四倍体孤雌胚胎发育	77
前言	77
1 材料与方法	77
2 结果	79
3 讨论	83
参考文献	85
第五章 用未去核 MII 期卵母细胞构建的牛体细胞克隆胚胎的体外发育和染色体结构	87
前言	87
1 材料与方法	88
2 结果	91
3 讨论	99
参考文献	101
结论	104
致谢	105
攻读学位期间发表的论文	107

缩略词表

Abbreviations

缩略语	英文	中文
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
CB	Cytochalasin B	细胞松弛素B
CD	Cytochalasin D	细胞松弛素D
COC	Cumulus-oocyte complex	卵丘-卵母细胞复合体
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	杜氏磷酸缓冲液
DMSO	Deimethyl Sulphoxide	二甲基亚砷
D-PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	杜氏磷酸缓冲液
D-PBS(-)	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline(free-Ca ²⁺ , Mg ²⁺)	杜氏磷酸缓冲液 (不含Ca ²⁺ , Mg ²⁺)
TE	Trophectoderm cells	滋养层
ICM	Inner cell mass	内细胞团
GVBD	Germinal vesicle breakdown	生发泡破裂
E2	Estradiol	雌二醇
FSH	Follicle stimulating hormone	促卵泡生成素
LH	Luteinizing hormone	黄体生成素
MPF	Maturation promoting factor	成熟促进因子
MAPK	mitogen-activated protein kinases	促分裂素原活化蛋白激酶
MLCK	myosin light chain kinase	肌球蛋白轻链激酶
RNT	reverse nuclear transfer	反向核移植
iPS cell	Induced pluripotent stem cell	诱导型多潜能干细胞
CR1aa	Charles Rosenkrans 1 amino acid	

引言

虽然体细胞克隆在多种动物中获得成功,但是克隆效率低成为目前困扰该项技术进行实际应用的最大限制因素^[1-3]。克隆效率受到众多因素的影响,其中包括卵母细胞因素、体细胞因素、体细胞核重编程程度、受体动物、植入后胚外组织的发育及其相关基因的表达、妊娠期管理、妊娠期营养以及核移植操作技术等。

卵母细胞发育成熟受卵泡内外环境许多因素的影响,而体外培养系统尚不完善,导致卵母细胞的体外成熟质量不高,进而影响体细胞核移植效率。哺乳动物卵母细胞恢复减数分裂后的核成熟进程研究在多种动物中有报道^[4-12]。由于在制备克隆胚胎时去核操作往往以第一极体为卵核所在位置的标志,因此尽量保证极体与卵母细胞核处于近邻位置,才有可能保证有效去核。这需要准确把握卵母细胞体外条件下发育到不同时期的时间点,用以掌握较佳的去除卵丘时间,以利于卵母细胞的去核,既不影响卵母细胞成熟,又保证去核的彻底。所以了解家畜动物卵母细胞体外成熟进程对于更好的把握体细胞核移植的相关时间切点,对于提高核移植效率具有重要意义。

微管 (microtubule, MT) 和微丝 (microfilament, MF) 是构成细胞骨架主要成分。微管和微丝之间的相互作用是很多细胞学过程完成所需的,其中包括减数分裂^[13-16]。微丝参与卵母细胞减数分裂过程中的多个细胞动力学事件,如纺锤体迁移、皮质颗粒向皮质区的移动、纺锤体锚定、同源染色体分离、胞质分裂收缩环的形成等^[17]。在小鼠卵母细胞纺锤体迁移过程中,肌动蛋白丝逐渐组装成一个纺锤体样结构^[18]。细胞松弛素 B (CB) 和细胞松弛素 D (CD) 是引起微丝解聚的药物,用 CB 处理小鼠卵母细胞,GVBD 可以发生,并且纺锤体照常形成,但不能迁移定位到皮质^[19-21]。当小鼠卵母细胞用 CD 处理,同源染色体能够发生分离,形成两个减数分裂纺锤体,但是最终不能发生胞质分裂,两个纺锤体又相互靠近融合形成一个大的纺锤体^[21],不能排出极体,形成二倍体卵母细胞。在猪上,CB 处理引起的现象与小鼠中相似^[22]。因此,通过 CB 处理获得二倍体卵母细胞可为获得四倍体胚胎提供一条可能途径。

哺乳动物多倍体在自然界中是一种染色体畸型,其自然发生率非常低。大多数多倍体胚胎往往在发育早期就死亡了,因此在自然界中很少存活有四倍体哺乳动物^[23]。科学家对哺乳动物四倍体胚胎发育能力进行了大量的研究。1973年, Snow 等^[24]用细胞松弛素 B 制作小鼠四倍体胚胎并移植成功获得 3 个四倍体小鼠,但以后再没有人能够重复出他的实验

结果^[25]。当四倍体胚胎细胞与一定数量的二倍体胚胎细胞进行联合的时候,四倍体胚胎细胞表现出向胚外组织发育的倾向性分布的特点^[26]。四倍体胚胎作为一种研究机体发育的有力工具,自发出现的概率很低,因此有必要人为制作大量的四倍体胚胎以作研究之用。在实验室中,制作哺乳动物 4n 胚胎的形成通常主要通过细胞核移植法^[27]、抑制卵裂球分裂法^[24]、细胞融合法^[28-30]来制备。目前,四倍体胚胎最重要的用途之一一是用于 ES 细胞和 IPS 细胞的四倍体补偿实验。四倍体细胞具有发育为胚外组织的趋势,胚外组织比胚胎组织环境可能更有利于四倍体细胞的生存。四倍体胚胎与 ES 细胞发育潜能具有相反性或者说是互补性,而利用这种相反性或者互补性就可以克隆出完全由 ES 细胞发育而来的动物^[31]。因此用胚胎干细胞(ES)和 4n 细胞聚合形成嵌合体后获得完全由 ES 细胞来源的动物时,四倍体细胞是非常有优势的^[32-34]。在近期的研究中,四倍体囊胚作为中间受体获得了存活的小鼠 IPS 细胞来源的后代^[35,36]。此外,针对克隆动物生产中出现的胎盘异常等引起的效率低下现象,通过将四倍体小鼠胚胎与普通克隆胚胎或普通克隆胚胎的内细胞团聚合,克服了胎盘异常现象,聚合胚胎的出生率得到显著提高^[37],这为高效地获得转基因克隆动物提供了途径。。

核移植中体细胞的重编程要在供体细胞转入和合子转录这样短暂的时间间隔中发生。越来越多的证据表明供体细胞核的不完全重编程(incomplete reprogramming)可能是导致克隆失败的重要因素。植入核的重编程是否彻底是与受体卵母细胞胞质状态密切相关的。供体核和受体卵胞质之间的相互作用很大程度上应该取决于卵胞质的状态^[38,39]。在去核操作时,把卵母细胞的 MII 纺锤体和其周围的少量胞质一同去除。这些胞质的去除可能伴随有一些胞质因子的丢失,而这些因子可能对重编程是非常关键的^[40,41]。与卵母细胞核相关的母源物质的存在可能在供体核的重编程过程中发挥作用^[42,43]。反向核移植(reverse nuclear transfer, RNT)研究表明^[42,44-46],完整的卵母细胞能够有利于体细胞的重编程。因此,深入探讨卵母细胞的发生与成熟过程及其机制,不仅对有性生殖有重要意义,对于动物的无性繁殖与生殖具有更大的意义。

本实验研究了牛、山羊和绵羊三种家畜动物卵母细胞的核成熟进程和细胞骨架动态变化、CB 处理诱导牛二倍体卵母细胞和四倍体孤雌胚胎的形成、以未去核卵母细胞为胞质受体时卵母细胞核对体细胞重编程的影响、未去核卵母细胞为胞质受体时多倍体胚胎形成等。本研究将为提高核移植效率、研究体细胞重编程机制、研究克隆动物发育异常机制等奠定一定基础,进而为提高转基因动物生产提供参考。

参考文献:

- [1] Wakayama, T., Perry, A.C., Zuccotti, M., et al. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 1998, 394: 369–374.
- [2] Hill, J.R. Abnormal in utero development of cloned animals: implications for human cloning. *Differentiation* 2002, 69, 174–178.
- [3] Campbell, K.H.S., and Alberio, R. Reprogramming the genome: role of the cell cycle. *Reproduction* 2003, Suppl. 61: 477–494.
- [4] Li GP, Liu Y, Bunch TD, White KL, et al. Asymmetric division of spindle microtubules and microfilaments during bovine meiosis from metaphase I to metaphase III, *Mol Reprod Dev*, 2005, 71: 220–226
- [5] Fulka J Jr, Motlik J, Fulka J, et al. Effect of cycloheximide on nuclear maturation of pig and mouse oocytes, *Reprod Fertil*, 1986, 77: 281–285
- [6] 赵涵, 李媛, 高选等. 人类卵母细胞减数分裂进程及形态学研究. *解剖学报*, 2006(4): 479–483
- [7] 黄雅琼, 石德顺, 张晓溪等. 猪卵母细胞体外成熟过程中的减数分裂进程. *中国细胞生物学学报*, 2010, 32(1): 84–90
- [8] Sirard MA, Florman HM, Leibfried-Rutledge ML, et al. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes, *Biol Reprod*, 1989, 40:1257–1263
- [9] Moor RM, Crosby IM. Protein requirements for germinal vesicle breakdown in ovine oocytes, *Embryol Exp Morphol*, 1986, 94:207–220
- [10] 马所峰, 罗明玖, 苗义良等. 山羊卵母细胞的减数分裂进程, *实验生物学报*, 2004, 37: 9–13
- [11] Willis P, Caudle AB, Fayer-Hosken RA. Equine oocyte in vitro maturation: influences of sera, time, and hormones, *Mol Reprod Dev*, 1991, 30:360–368.
- [12] Goodrowe KL, Hay M, King WA. Nuclear maturation of domestic cat ovarian oocytes in vitro, *Biol Reprod*, 1991, 45:466–470
- [13] Olnier S, O'Brien LL, Wiese C, and Bement WM. Myosin-10 and actin filaments are essential for mitotic spindle function. *J. Cell Biol.* 2008: 182, 77–88.
- [14] Goode BL, Drubin DG, and Barnes G. Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2000, 12: 63–71.
- [15] Rodriguez OC, Schaefer AW, Mandato CA, Forscher P, Bement WM, and Waterman-Storer CM. Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nat. Cell Biol.* 2003, 5: 599–609.
- [16] Goode BL and Eck MJ. Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annu. Rev. Biochem.* 2007, 76: 593–627.
- [17] Sun, Q.Y., and Schatten, H. Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization. *Reproduction* 2006, 131: 193–205.
- [18] Azoury J, Lee KW, Georget V, Rassiner P, Leader B, Verlhac MH. Spindle positioning in mouse oocytes relies on a dynamic meshwork of actin filaments. *Curr Biol* 2008, 18: 1514–1519.
- [19] Verlhac MH, Lefebvre C, Guillaud P, et al. Asymmetric division in mouse oocytes: With or without Mos.

Curr. Biol. 2000, 10: 1303-1306.

- [20] Dumont J, Million K, Sunderland K, et al. Formin-2 is required for spindle migration and for the late steps of cytokinesis in mouse oocytes. *Dev Biol* 2007, 301: 254-265.
- [21] Kubiak J, Paldi A, Weber M, Maro B. Genetically identical parthenogenetic mouse embryos produced by inhibition of the first meiotic cleavage with cytochalasin D. *Development*. 1991, 111(3): 763-769.
- [22] Somfai, T., Ozawa, M., Noguchi, J., et al. Diploid porcine parthenotes produced by inhibition of first polar body extrusion during in vitro maturation of follicular oocytes. *Reproduction* 2006, 132:559-570.
- [23] Li GP, Cai SX, Xu LB, et al. Studies on the early development of mouse tetraploid embryos produced by electrofusion. *Developmental & Reproductive Biology*, 2000, 7(1): 17-23.
- [24] Snow MH. Tetraploid mouse embryos produced by cytochalasin B during cleavage. *Nature*, 1973, 244(5417): 513-515.
- [25] Kaufman MH, Webb S. Postimplantation development of tetraploid mouse embryos produced by electrofusion. *Development* 1990, 110: 1121-1132.
- [26] Tang PC, Ritchie WA, Wilmut I, West JD. The effects of cell size and ploidy on cell allocation in mouse chimaeric blastocysts. *Zygote*, 2000, 8(1): 33-43.
- [27] Modlinski JA. The fate of inner cell mass and trophectoderm nuclei transplanted to fertilized mouse eggs. *Nature*, 1981, 292: 342-343.
- [28] O'Neil GT, Speirs S, Kaufman MH. Sex-chromosome constitution of postimplantation tetraploid mouse embryos. *Cytogenet Cell Genet*, 1990, 53: 191-195.
- [29] Wakayama T. Cloning of male mice from adult tail-tip cells. *Natl Genet*, 1999, 22: 127-128
- [30] Baguisi A, et al. Induced enucleation in nuclear transfer procedures to produce cloned animals. *Theriogenology*, 2000, 53: 209
- [31] kin GS, Behringer RR. Tetraploid development in the mouse. *Dev Dyn* 2003, 228: 751-766.
- [32] Nagy A, Rossant J, Nagy R, et al. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993, 90: 8424-8428
- [33] Ueda O, Jishage K, Kamada N, et al. Production of mice entirely derived from embryonic stem (ES) cell with many passages by coculture of ES cells with cytochalasin B induced tetraploid embryos. *Exp. Anim.* 1995, 44: 205-210.
- [34] Wang ZQ, Kiefer F, Urbánek P, et al. Generation of completely embryonic stem cell-derived mutant mice using tetraploid blastocyst injection. *Mech. Dev.* 1997, 62: 137-145.
- [35] Zhao XY, L W, Lv Z, et al. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature* 2009, 461: 86-90.
- [36] Kang L, Wang J, Zhang Y, et al. iPS cells can support full-term development of tetraploid blastocyst-complemented embryos. *Cell Stem Cell*. 2009, 5: 135-138.
- [37] Jiangwei Lin, Linyu Shi, Man Zhang, et al. Defects in Trophoblast Cell Lineage Account for the Impaired In Vivo Development of Cloned Embryos Generated by Somatic Nuclear Transfer. *Cell Stem Cell*, 2011, 8: 371-375
- [38] kyo N, Wade P, Guschin D, et al. Active remodeling of somatic nuclei in egg cytoplasm by the nucleosomal ATPase ISWI. *Science* 2000, 289: 2360-2362.

- [39] Prather R, Kuchholzer B, Lai L, et al. Changes in the structure of nuclei after transfer to oocytes. *Cloning* 2000, 2: 117–122.
- [40] Miyoshi K, Rzucidlo SJ, Pratt SL, et al. Improvements in cloning efficiencies may be possible by increasing uniformity in recipient oocytes and donor cells. *Biol. Reprod.* 2003, 68: 1079–1086.
- [41] Lee JH, Campbell KHS. Effects of enucleation and caffeine on maturation-promoting factor (MPF) and mitogenactivated protein kinase (MAPK) activities in ovine oocytes used as recipient cytoplasts for nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 2006, 74: 691–698.
- [42] Kang YK, Koo DB, Park JS, et al. Influence of oocyte nuclei on demethylation of donor genome in cloned bovine embryos. *FEBS Lett.* 2001, 499: 55–58.
- [43] Gao S, Gasparrini B, McGarry M, et al. Germinal vesicle material is essential for nucleus remodeling after nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 2002, 67: 928–934.
- [44] Munsie M, O'Brien C, and Mountford P. Transgenic strategy for demonstrating nuclear reprogramming in the mouse. *Cloning Stem Cells* 2002, 4: 121–130.
- [45] Peura TT. Improved In Vitro Development Rates of Sheep Somatic Nuclear Transfer Embryos by Using a Reverse-Order Zona-Free Cloning Method. *Cloning and stem cells*, 2003, 5(1): 13-24
- [46] Hui Yang, Linyu Shi, Shenghua Zhang, et al. High-efficiency somatic reprogramming induced by intact MII oocytes. *Cell Research* 2010, 20: 1034-1042.

文献综述

第一章 哺乳动物卵母细胞的不对称分裂与

实验条件下的多倍体胚胎发生

一、哺乳动物卵母细胞的不对称分裂及其发生机制

卵母细胞在减数分裂过程中,经历两次细胞分裂而不经 DNA 复制期,从而形成具有受精能力的单倍体卵子。这个过程对于获得具有整倍体核型后代是非常关键的。卵母细胞的减数分裂是极度不对称的,每次分裂都要保证母源基因组的准确分离和胞质的高度不对称分布,从而形成一个小的极体和一个大的卵母细胞。这个不对称分裂过程受到一系列分子的密切调控,尤其是微管和微丝。减数分裂的不对称性是由第一次减数分裂纺锤体和第一极体的不对称定位决定和形成的,接着由第二次减数分裂纺锤体和第二极体的极性位置来延续。但哺乳动物卵子减数分裂过程中调节纺锤体不对称位置的分子机制仍旧不甚清楚。

1. 不对称分裂

不对称细胞分裂是指一个细胞分裂成两种不同发育潜能的细胞,是产生细胞多样性的基本方式之一。不对称分裂产生的两种类型的细胞在大小、形态和胞质物质分布上均有所不同。胞质物质在细胞内出现极性化分布,胞质分裂时将这些物质在子细胞呈不均等分配,从而使得许多组织中产生两种不同发育潜能的细胞。许多不对称分裂细胞在分裂前需要在细胞内产生不对称性,也就暗示着需要极性建立分子的存在。即细胞极性(cell polarity)形成是细胞不对称分裂的前提。细胞极性是指细胞中,某些胞质成分按一定空间顺序不均等分布,从而形成各种细胞内容物的浓度梯度。正是由于细胞极性的存在导致了细胞的不对称分裂(asymmetric cell division)^[1]。

不对称分裂的共同特点是:母细胞首先形成胞质物质的极性化分布,细胞命运决定分子(包括 mRNA 和蛋白质)即进行极性化分布。其分布过程主要是通过细胞骨架的参与,形成细胞分裂的轴,最终导致两种不同命运细胞的产生^[2]。对不同种类进化保守细胞的研究表明,细胞表面分子通过关键的分子通路影响细胞骨架的组装和蛋白质的运输,从而产生细胞极性^[3]。绝大多数生物细胞是极性化了的,包括单细胞生物,多细胞生物和哺乳动物。而极性细胞的形状却各不相同,如哺乳动物神经元可达数米长,而多细胞生物的上皮细胞

呈小方形只有 5-30 μm 。细胞形状的不同恰好与细胞具有不同功能密切相关,如神经元可在距离较远组织间进行细胞信号传导,上皮细胞可在不同生物过程中调节内环境稳定。细胞极性的建立和维持对许多类型细胞的功能有重要作用。而正常的细胞极性一旦丧失,往往引起异常现象或疾病发生,如引发胃肠功能失调、肾衰或恶性肿瘤^[4-6]。

2. 卵母细胞的不对称分裂

2.1. 不对称分裂方式

在所有种属动物中,卵子减数分裂(meiosis)都是典型的不对称分裂。不对称分裂的目的是保证维持卵子生长过程中积累足够量的储存物质。其中很多是关键的母源性效应物,用于卵子支持受精后胚胎的发育^[7-9]。卵母细胞经过连续两次不对称分裂产生一个大的卵子和两个注定凋亡的小极体^[10]。哺乳动物卵母细胞不对称分裂的基础是纺锤体在细胞皮质区的定位和维持。在小鼠卵母细胞中,生长中的卵母细胞的生发泡 (germinal vesicle, GV) 是从卵母细胞的周边向中央区域逐渐定位。到前期末时, GV通常位于轻微偏离中心的位置^[11,12]。第一次减数分裂恢复时,发生GVBD (GV breakdown),染色体凝集,微管逐渐在染色体周围组装成一个双极纺锤体^[13]。在第一次减数分裂后期和末期 (anaphase I/telophase I, AI/ТИ) 时,纺锤体迁移到卵母细胞皮质区。迁移是沿着纺锤体轴进行的,并且指向距离最近的皮质区域,从而使迁移路径最小化^[14]。迁移过程一结束,第一极体 (the first polar body, PB1) 排出过程即启动。PB1排出以后,卵母细胞进入第二次减数分裂,双极纺锤体在PB1下方迅速组装形成^[15,16]。在MII停滞期间,纺锤体轴与质膜平行。受精或激活后启动卵母细胞进入后期II,纺锤体发生90°旋转进行第二次不对称分裂并排出PB2^[17]。这些事件在多数哺乳动物中相对保守,主要的区别在于前期GV核的定位存在些差别。在人卵母细胞中, GV位置从轻度偏离中心^[18,19]到明显偏离中心^[20]都存在。牛、猪和马的GV通常是偏中心定位的。从而第一次减数分裂纺锤体向皮质的迁移路线很短^[21-28]。

2.2. 不对称分裂的功能性结果

不对称分裂的一个功能是产生一个能够结合精子、进一步受精并产生胚胎的细胞。不对称分裂后使极体体积最小化对于受精是很必要的。由于极体表面积小,并且没有微绒毛,从而不能结合精子^[29]进而不能受精^[30]。但是卵子体积最大化则不一定是必要的。不对称分裂的另一个结果是形成“极化”的卵子。果蝇卵子是极化的一个代表,在这种意义上,胞质和皮质的不对称组织方式与发育相关物质的不对称分布有关,主要是mRNA,它们决定了胚胎将来的发育模式^[31]。在哺乳动物中,已有证据表明,胚胎或胎轴的发育与卵子的组织方式无关^[32]。因而推测,哺乳动物卵母细胞的极化不是具有十分重要的意义,被认

为是细胞的非均质化组织方式。卵母细胞有高度分化的局部皮质结构域,该区域有染色体,与卵母细胞其他区域不同,该区域没有微绒毛,第二次减数分裂纺锤体形成后即平行于此区域,决定了PB2排放的位置。这个结构域的组建和维持对受精的完成是很关键的。老化的低质量卵子就缺失这个分化区域。由于微绒毛促进与精子的相互作用^[33],卵母细胞的分化结构域没有精子结合能力^[29,34]。在受精时,PB2的排出和精子的穿入发生在不同的区域。此外,研究发现MII期卵母细胞表面无微绒毛区域(皮质重组区)的机械张力比其他微绒毛丰富区域高2.5倍^[35],可能对胞质分裂环形成和PB2排出起作用。

卵子极化还形成了卵周隙的不对称性。体内受精的小鼠卵子受精时精子优先在有极体的半球穿入。这种几何学已被证明依赖于与PB1排出相关联的卵周隙的不对称性。PB1一旦排出,不会马上退化。它停留在卵母细胞和透明带之间的卵周隙中,使其临近的卵周隙扩张。Motosugi等^[29]的研究显示,极体附近的这种间隙扩张增加了精子在极体所在半球穿入的可能性。

2.3. 不对称分裂过程中的皮质重组

在第一次减数分裂的初期,哺乳动物卵母细胞的皮质在形态上是均一的。卵母细胞的表面均匀地被微绒毛覆盖。皮质颗粒也在胞质中均匀分布。随着卵母细胞的成熟,皮质颗粒向皮质区迁移。在第一次减数分裂过程中,当纺锤体到达皮质,覆盖于纺锤体上方的皮质发生明显重组。这个过程在哺乳动物物种间是保守的。微绒毛解离,质膜下方聚集微丝形成所谓的肌动蛋白(actin)帽^[26,36]。同时,这个区域皮质颗粒的密度也明显下降,可能是由于皮质颗粒的早熟性胞吐或皮质颗粒的重新分布^[37-39]。皮质重组对于极体的形成及其形状有重要作用。在有丝分裂中,胞质分裂面是由中期纺锤体的赤道板决定的,纺锤体决定了分裂沟的位置^[40]。卵母细胞中不是这样,而是后期和极体排出同时启动。皮质重组通过局部修饰皮质的物理性质,可能有助于纺锤体突起和PB1排出区域的确定^[14]。在第二次减数分裂过程中,纺锤体重新形成并锚定在卵母细胞皮质区。覆盖于纺锤体上方的皮质区继续维持修饰状态,使卵子保持极化特征^[41]。

2.4. 卵子老化对不对称分裂的影响

受精时间拖延会引起MII卵子老化。这个过程称为排卵后老化。MII停滞时间延长时,actin帽逐渐变薄。同时,纺锤体开始向细胞中心迁移^[42]。卵母细胞整个表面开始变均匀,微绒毛减少并且密度均匀^[21-23,43,44],皮质颗粒也逐渐向内部迁移^[44],逐渐失去不对称性。母体变老也会以同样的方式破坏卵子的不对称性^[43-45]。失去不对称性不利于成功受精。理论上,内化的皮质颗粒不能被快速募集到质膜。因此受精时,皮质颗粒在卵周隙中的胞吐

及其引起的阻止多精受精（形成屏障）失败。这种卵母细胞自发激活率增加。在实验激活时，它们经历卵裂或碎裂^[21-23,41]。因此，卵母细胞明显的不对称形态可能是卵子质量的标准。而且，减数分裂恢复可能决定了受精可发生的时间窗口^[41]。

3. 卵母细胞不对称形成的机制

3.1 纺锤体迁移机制

在线虫、果蝇和海参卵母细胞中，纺锤体迁移是由微管控制的^[46-48]。但是在小鼠卵母细胞中，纺锤体的迁移和锚定主要依赖于微丝。抑制微丝的聚合会抑制这两个过程的发生^[49,50]。研究显示，纺锤体迁移依赖于一个特异的肌动蛋白丝成核因子Formin2^[51,52]。最近，研究者通过对成熟过程中的活体小鼠卵母细胞进行实时观察，了解了actin网络支持纺锤体的运动^[53,54]。研究结果显示，在纺锤体迁移之前，胞质中已经存在一个完整的微丝网络。这个网络发生动态变化并且不断重塑。纺锤体迁移起始时，微丝网络在纺锤体周围变得致密。微丝沿着纺锤体微管形成一个鞘，这个结构引导纺锤体迁移^[53,54]。

多数报道都认为纺锤体的迁移不依赖于微管，用微管聚合抑制剂nocodazole处理卵母细胞破坏微管之后，染色体仍然能迁移到最近的皮质区^[14]，从而认为其迁移是在致密的微丝网络作用下实现的^[53]。此外，在去除染色体的情况下仍然形成双极纺锤体，这个纺锤体也定位到卵母细胞皮质区^[55]。这些结果表明染色体和微管（或微管组织中心）能够与微丝直接作用参与纺锤体定位。最近的研究发现^[56]，在大鼠卵母细胞中，用高浓度的nocodazole处理使微管彻底解聚时，凝缩的染色体不能发生迁移，而用低浓度的nocodazole处理部分解聚微管，但纺锤体部分保留时就能够迁移到皮质。低浓度nocodazole处理引起MII期小鼠和大鼠卵母细胞时纺锤体不能旋转，从而不能突破MII阻滞^[56,57]。这些结果说明微管是否参与哺乳动物卵母细胞纺锤体迁移还有待进一步阐明。

卵母细胞的高尔基复合体均匀分布在胞质中。用特异性药物处理卵母细胞破坏高尔基复合体会完全抑制纺锤体迁移^[58]。这个结果说明，单个的高尔基复合体颗粒可能通过将微管局部锚定参与纺锤体迁移，并一步步促进纺锤体移动。

牵引纺锤体迁移的动力来自微丝动力学^[59]和与actin相关联的马达蛋白myosin。在爪蟾卵母细胞中，Myosin 10对于纺锤体在皮质区的锚定是必需的，在这个过程中，它可能作为微管-微丝的联结分子起作用^[60]。Myosin 10的转录物在小鼠卵母细胞中比较丰富^[61]，并且这个马达蛋白可能将纺锤体微管和actin网络连结起来。此外，myosin 2的激活形式也在纺锤体极富集^[54,62]。这个马达蛋白可能参与产生纺锤体迁移时牵引力的产生。各种myosin很可能通过推动纺锤体微管和纺锤体极产生牵引纺锤体移动的力量。

Myosin是由myosin轻链激酶（myosin light chain kinase, MLCK）激活的。抑制MLCK，能够破坏纺锤体迁移^[54,62]。MLCK是MAPK的底物^[63]。Mos/MAPK通路是减数分裂细胞周期的主要调控者，对纺锤体定位也很重要。敲除小鼠的mos基因引起纺锤体迁移缺陷^[14]。抑制该通路的其它成员也出现类似的表型^[64]。因此，mos/MAPK激酶途径通过MLCK很可能控制参与纺锤体迁移的myosin的激活。在很多哺乳动物的卵母细胞中，MAPK的活性在GVBD之后是逐渐增加的，其活性动力学可能决定了每种哺乳动物特异的第一次减数分裂纺锤体迁移起始的时间。

3.2 皮质重组的机制

有研究表明，在小鼠卵母细胞的皮质成熟过程中染色体发挥重要作用。这一活性最初是在小鼠的MII卵子中发现的，覆盖于MII纺锤体上方的区域没有微绒毛和皮质颗粒，但是富含微丝^[49,65-67]，形成actin帽。没有微管时，染色体仍然能够迁移并且保持其诱导皮质重组的能力^[68]。用nocodazole处理停滞于MII期的卵母细胞诱导染色体分散成几簇分布于整个皮质区，每个染色体簇诱导其上方皮质的局部分化，其特点都是没有微绒毛，但是富含actin（图1）^[49,50]。将精子染色质注射到MII卵子的胞质中也证明了染色质在这一过程中的重要作用^[69]。此外，将染色质包被的颗粒注射到MII期卵母细胞中能够诱导皮质重组^[70]。这种重组是在包被颗粒跟皮质之间没有任何物理相互作用下发生的。新形成actin帽的程度依赖于注射染色质颗粒的数量。另外还依赖于颗粒到皮质之间的距离，距离远的颗粒不能诱导皮质重组。这些结果证明，染色体本身通过距离效应启动皮质重组。

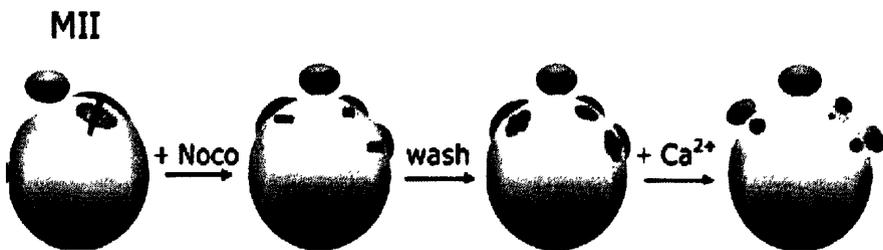


图 1-1 染色体诱导皮质分化 (Azoury et al, 2009)

MII期卵母细胞用nocodazole 处理(+Noco)，然后清洗去除药物(wash) 并进一步激活(+Ca²⁺)。蓝色：染色体；红色：微丝；绿色：微管

这个效应取决于小GTPase RAN。在有丝分裂过程中，与GTP结合的活性形式的RAN（RAN-GTP）在间期滞留在细胞核中，并以梯度分布，这是由于其特异的GTP交换因子RCC1定位在染色质上。在此RAN-GTP梯度中，微管装配需要的特异因子被激活并促进纺锤体形成^[71]。在小鼠卵母细胞中，用基于荧光共振能量转移技术（FRET）的探针检测

Ran-GTP的变化证明,在成熟过程中Ran-GTP以染色质为中心呈梯度分布^[15]。如果这个梯度发生变化那么染色体或染色质包被颗粒周围不能出现皮质重组^[70],证明RAN-GTP在这个过程中起主要作用。这个发现也说明染色体迁移和皮质重组间关系密切。在小鼠卵母细胞中,RAN-GTP梯度以染色体为中心,在第一次减数分裂开始时位于远离皮质的区域。在第一次减数分裂晚期,染色体迁移到皮质区,通过RAN-GTP启动皮质重组。RAN的下游分子可能是另一个小GTPase—ras相关的C3肉毒素底物(RAC)。RAC均匀的分布于卵母细胞皮质,但是其GTP结合的活性形式只发现于重组区域。RAC的激活完全取决于附近染色质,说明RAN-GTP梯度在这个过程中可能的作用。抑制RAC活性影响纺锤体锚定,并引起纺锤体的解聚和MII卵母细胞不能形成actin帽,最终抑制第二极体的排出^[72]。在很多生物学过程中,RAC调控actin-myosin2复合物^[73]。因此可以推测,在RAN-GTP梯度控制下的RAC-GTP局部调控肌动球蛋白活性以诱导皮质重组。

皮质分化的区域将是卵裂沟形成的位置。因此,该区域在不对称分裂过程中发挥重要作用。MII卵母细胞用nocodazole处理之后再彻底清洗去除药物,微型纺锤体在染色体簇周围再现(图1)。对这些卵母细胞进行孤雌激活导致形成多个微型极体^[74]。而且,由于重组的皮质区域没有微绒毛,用于交换的表面减少。因此受精时精子的穿入在其他区域发生,从而雄原核不会由于第二极体的排出而丢失。

3.3 参与不对称分裂的相关分子

有关哺乳动物卵母细胞极性的分子机制还了解不深。除了了解formin-2^[51,54]和MAPK^[14]是微丝介导的MI纺锤体迁移所需要的之外,对于其他蛋白和分子如何参与建立和维持哺乳动物卵子极性还缺乏了解。在低等动物中,三个进化上保守并且相互作用的蛋白PAR-3、PAR-6和非典型蛋白激酶C(atypical Protein kinase C, aPKC)对于细胞极性的建立和维持是很关键的^[75-79]。在线虫中,这些蛋白对于前后极性的建立很关键,并且调控纺锤体定向和1-细胞胚胎的不对称细胞分裂。在果蝇中,PAR-3/PAR-6/aPKC的同源物作用于(1)调控卵母细胞的前后轴;(2)建立胚胎上皮细胞的顶-基底极性;(3)在神经细胞中产生不对称性。在哺乳动物细胞中,这个复合体通过紧密连接对于建立和维持上皮细胞顶-基底极性是很关键的。由于这三个蛋白的这些作用,可以认为它们是哺乳动物参与建立和维持卵子极性的候选分子。

在爪蟾卵成熟过程中,aPKC和XASIP(青蛙PAR-3同源物)共同定位于动物极半球^[80]。PAR3、aPKC和两种PAR6同系物(PAR6A和PAR6B)在小鼠卵母细胞中有表达。此外,在成熟过程中它们的定位发生变化^[81-83]。在第一和第二次减数分裂过程中在纺锤体和纺锤体

极上有aPKC和PAR6A分布。在第一次减数分裂结束时, PAR6A在靠近皮质的纺锤体极上富集^[81,82]。PAR3和PAR6B与第一次减数分裂纺锤体联系在一起。PAR3在极体排出前转移到actin帽的中央区域, PAR6B在第二次减数分裂时转移到actin帽区域^[82,83]。基于它们的动态学定位可以推测它们在卵母细胞极体形成和不对称分裂方面发挥作用。但在哺乳动物卵母细胞中, 它们的作用还没有得到分析, 只知道纺锤体的稳定需要aPKC^[81]。总之, PAR复合体如何在卵母细胞不对称中直接发挥作用、是否参与更多的上游事件例如微管纺锤体的形成和维持等还不清楚。

果蝇和线虫中调节不对称分裂的其他一些分子, 包括 G 蛋白相关的支架蛋白(Dlg, Epac, Rap1)和细胞命运决定蛋白(如 Numb, Pros 和 Brat)等在哺乳动物中均具有高度的保守同源性。正如在非脊椎动物中观察到的一样, 对应的哺乳动物蛋白在神经前体细胞中有明显的极性分布, 而且破坏这种极性会引起细胞极性缺失、纺锤体定向失误和子细胞命运的不同^[84-86]。Dlg 基因是一种肿瘤抑制基因, 鼠卵减数分裂过程诱导了 Dlg1 的极性分布, 这种极性化分布呈多步骤性, 受微丝和微管的调节。Dlg1 分布与细胞骨架的密切关系, 提示其可能参与或调节卵子极性形成^[87,88]。

PIP2 介导的信号通路对极体排出时维持收缩环的完整和卵裂沟的稳定十分重要^[89,90]。磷脂酶(phospholipase C, PLC)可以水解 PIP2 形成二酰基甘油(diacylglycerol, DAG)和三磷酸肌醇(IP3), 加入 PLC 的抑制剂, 使已经形成的卵裂沟快速退化。PIP2 在卵裂沟处集中, 吸引质膜定位到肌动蛋白环。实验表明, PIP2 无法启动卵裂沟的形成, 这个信号是由 RhoA 提供的。Rho-GEF (Ect2)和雄性生殖细胞 Rac-GTP 酶活化蛋白基因(MgcRacGAP)联合作用激活 PIP2, 通过 PIP2 调节 ERM(埃兹蛋白/根蛋白/膜突蛋白)活性, 促进收缩环定位和形成。PIP2 的两种水解产物: IP3 和 DAG 通过通路下游的钙离子和蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC)促进肌球蛋白 II 的收缩。

哺乳动物中, 可受精卵子的形成必须要经过不对称减数分裂过程。这个过程保证了形成一个大的卵母细胞和小的极体, 从而在卵子中保留了大量可供胚胎发育的物质。不对称分裂过程使得卵子处于一种不对称组织状态或极化状态, 这决定了精子穿入区域和成功受精。在体细胞克隆过程中, 受体卵母细胞的去核是成功克隆的前提条件之一。而在去核过程之, 随着卵子遗传物质的去除, 其周围的一些胞质也被吸走了, 胞质中可能富含一些重要的参与核重编程的物质。这些物质的存在形式可能就是不对称分裂引起的物质极化所致。近年来, 人们开始用大规模的比较转录组学分析对卵母细胞进行研究。同时, 对成熟过程中卵母细胞进行高分辨率活体拍照的技术也发展起来。这些技术的应用将使我们能够更好

的了解不对称分裂的分子机制。对不对称分裂机制的深入了解,可能有助于体细胞克隆机制的了解。

二、微丝及其在卵母细胞不对称分裂过程中的作用

卵母细胞的不对称减数分裂产生一个大的卵子和两个小的极体。为了达到不对称的目的,哺乳动物卵母细胞的纺锤体要从细胞中央迁移到皮质区。在很多哺乳动物中,包括人、小鼠、牛、猪和仓鼠,纺锤体的迁移似乎都有赖于微丝。微丝也称肌动蛋白丝,是由肌动蛋白(actin)组成。微丝与微丝结合蛋白、肌球蛋白三者构成化学机械系统,产生机械运动。微丝参与卵母细胞减数分裂过程中的多个细胞动力学事件。除了牵引纺锤体迁移,还介导皮质颗粒向皮质区的移动、皮质纺锤体锚定、同源染色体分离、参与胞质分裂收缩环的形成等。微丝在卵母细胞成熟过程中的作用及调控在近年的研究中受到越来越多的关注。

1. 微丝的生化特点

微丝由肌动蛋白组成。肌动蛋白单体呈球状,被称为球状肌动蛋白(globular actin,G-actin),其分子量为43 kD,在生理状态下可以装配成具有分子极性的螺旋结构微丝。根据肌球蛋白(myosin)结合微丝后的箭头状装饰形态,把微丝人为地分为两个端口,即刺端(barbed end)和尖端(pointed end)。刺端的组装速度较尖端快约10倍,因此又常被称为正端(plus end);而尖端则被称为负端(minus end)。在迁移细胞中,刺端往往朝向细胞膜。微丝的聚合生长受到能量和多种相关蛋白的调节。在生理条件下,肌动蛋白聚合成丝可分为肌动蛋白活化(activation)、成核(nucleation)、生长(elongation)和稳态(steady state)四个过程。离子的置换(Mg^{2+} 代替 Ca^{2+})可以引起肌动蛋白构象的变化和活化。成核期是微丝聚合的关键步骤。激活的肌动蛋白可以聚合成二聚体、三聚体或四聚体。肌动蛋白二聚体极不稳定,只有在一些成核蛋白如Arp2/3复合体^[91]、formin^[92]、spire^[93]等辅助因子的参与下形成肌动蛋白多聚体核心,并以此为基础继续聚合。ATP结合的单体肌动蛋白,对微丝的正端具有高亲和力,可以源源不断地结合到正端,形成丝状肌动蛋白(filamentous actin,或F-actin)。在F-actin生长的过程中,结合的ATP可被水解为ADP和磷酸,而ADP-actin与微丝负端的亲和力下降,易从负端脱落下来。随着肌动蛋白的聚合,体系中的G-actin浓度下降到临界浓度,此时肌动蛋白结合到两端的速度和从两端解离速度相当,即体系处于平衡状态,肌动蛋白的聚合达到稳态。就单根微丝而言,进入稳态后正端的生长速度与负端的解离速度等同,所以总长度则保持恒定。细胞内G-actin一般为ATP结合形式,而F-actin负端解离后的G-actin呈ADP结合状态,表明F-actin的解聚不仅仅是

聚合的逆过程。

2. 肌动蛋白成核

成核是肌动蛋白丝聚合的限速步骤，微丝增长的方式包括分支增长和直线增长。目前为止，已发现三类主要的actin成核因子。

第一类是Arp2/3 (actin related protein 2/3) 复合体。单独的Arp2/3复合体只有简单的成核作用，而当它与成核促进因子(nucleation-promoting factors, NPFs)、ATP、微丝母链结合后，就会在它存在的位置形成分支点，在微丝侧面启动形成侧枝^[94]。细胞中内源性Arp2/3复合体的激活因子是Wiskott-Aldrich Syndrome Proteins (WASP) 家族成员（它的单位点基因突变可导致Wiskott-Aldrich综合症，是一种X染色体连锁的血小板、白细胞功能缺失疾病）^[95]，而WASP本身又可以被小G蛋白激活。这样，胞外刺激信号通过作用于一系列受体，激活小G蛋白，导致WASP和Arp2/3的相继激活^[96]。WASP羧基端可以持续活化Arp2/3复合体。天然状态下WASP通过分子内部的折叠，可抑制其自身活性，Cdc42-GTP、PIP2等上游信号分子与WASP结合，将WASP锚定至靶位点打开其结构，以解除其活性的自我抑制，这时Arp2/3复合体才能被募集并活化。活化的Arp2/3复合体在已经长成的微丝侧面以70度的角度重新聚集成核，导致新的微丝枝杈的生长^[94]。

第二类是Spire蛋白，该蛋白诱导直线型微丝形成，与Arp2/3一样结合到微丝的尖端。因为刺端被存在于细胞中的actin加帽蛋白(capping protein, CP) 保护，这种成核因子产生相对短的微丝。

Formins是第三类肌动蛋白丝成核因子。它们是高度保守的蛋白，在很多生物体中表达，通常含有三个FH结构域(FH1, FH2, FH3)^[97]，FH2结构域是formin促进肌动蛋白聚集成核及微丝继续伸长所必需的^[98]。天然状态下formin的羧基端与氨基端相互作用而使得其活性处于自我抑制状态，小G蛋白Rho可以与formin的氨基端结合，使得FH1-FH2结构域被释放，进而解除自我抑制并使之活化^[99]。Formins结合到肌动蛋白丝的刺端，使其不受帽状蛋白的保护。最终，formins诱导相对长的直线型微丝的形成^[100]。Formins在很多不同细胞功能中发挥作用，包括胞质分裂、细胞迁移过程中丝状伪足的形成^[101]、细胞粘附、内吞作用、细胞极性、微管稳定和微管-肌动蛋白相互作用等过程^[96]。它们可分为两类：一类是来自Diaphanous 家族的蛋白，其特征是有Rho-GTPase结合结构域；另一类是来自Cappucino家族的蛋白，没有Rho-GTPase结合结构域^[102]。FH1与肌动蛋白-前纤维蛋白(actin-profilin)复合物结合，将肌动蛋白单体传递给FH2结构域，前纤维蛋白被释放出来，最终形成一个直线增长的微丝结构。小鼠Formin2基因编码一个166kDa的蛋白^[103]，含有FH1和FH2结构域，但是

没有明显的FH3结构域。Formin2是果蝇Cappucino的同源物。在小鼠中，它只在中枢神经系统和卵母细胞中表达^[51,103]。

3. 微丝动态变化的调节

肌动蛋白有多种结合蛋白。其中解聚因子（actin disassembly factor,ADF）和加帽蛋白（capping protein,CP）分别独立地调节肌动蛋白的动态变化。ADF的活性是通过磷酸化/去磷酸化的方式被调控从而应答刺激信号。Slingshot磷酸酶可去磷酸化ADF从而使之活化^[104]；而Rac调节的LIM蛋白激酶磷酸化ADF使之灭活^[105]。活化的ADF可以加速微丝负端的单体解离，而负端的单体解离恰恰是微丝细胞骨架滚动循环的限速步骤。解离的加速提高了单体肌动蛋白-ATP复合体的浓度，高浓度的单体肌动蛋白-ATP复合体又可以促进正端的快速生长，从而平衡了负端的快速解聚。Profilin是肌动蛋白的另外一种结合蛋白。解离的单体肌动蛋白呈ADP结合状态，profilin促进单体肌动蛋白上结合的ADP与ATP的交换，使单体肌动蛋白成为ATP结合状态，参与新一轮微丝正端的聚合。它与ADF协同起作用^[106]。

CP加帽终止微丝刺端持续伸长从而限制微丝的长度，与长丝相比，短的微丝更为刚硬，从而保证有效地产生推动力；此外，加帽还可以及时封闭许多无效微丝生长的端口，使游离的单体肌动蛋白供应有限的正端生长，从而保证受力方向的微丝有效而快速地生长^[107]。

4. 肌动蛋白骨架在细胞内的驱动作用机制

肌动蛋白骨架通过三种机制驱动细胞内物质的运动。第一个机制是肌动蛋白丝或肌动蛋白束为马达蛋白的运输提供轨道，例如myosin5的运输^[108]。这种基于肌动蛋白的运动性主要在细胞器和膜泡运输方面起作用。第二，细胞的收缩网络由肌动蛋白和myosin2组成，能够驱动皮质流动和信号传导分子^[109]以及中心体等结构^[110]的运输。在海星卵母细胞中，收缩性肌动蛋白网络还驱动最初阶段的染色体凝集^[111]。第三，肌动蛋白通过在微丝刺端发生聚合从而产生推动力，这对运动型细胞的运动时很关键的^[107]。

5. 微丝在卵母细胞减数分裂过程中对纺锤体迁移的作用

卵母细胞发生GVBD后，纺锤体在细胞中心形成并迁移到皮质中。这与同时期微丝的分布变化一致。有关哺乳动物卵母细胞中微丝在减数分裂中的作用的研究主要在小鼠上进行。用引起微丝解聚的细胞松弛素B（CB）或细胞松弛素D（CD）处理小鼠卵母细胞，GVBD可以发生，并且纺锤体照常在细胞中心形成，但不能迁移定位到皮质^[14,15,112]。Jasplakinolide是踏车运动的阻滞剂，可促进微丝聚合和稳定。用Jasplakinolide处理小鼠卵母细胞的效果与细胞松弛素B的效果相同^[113]。由此说明，微丝介导纺锤体从细胞中心向皮质的迁移，这种迁移是有微丝的聚合驱动的^[59]。近来研究表明染色体可能参与这一迁移过程。微丝与染色体

通过PAR 蛋白家族的PARD6A 结合,形成复合物调节纺锤体的运动^[10]。PARD6A 是第一种被发现与纺锤体迁移有关的蛋白质。小鼠卵母细胞中,纺锤体刚开始迁移时,PARD6A均匀的分布在纺锤体上,GVBD 后6 h,PARD6A 聚集到接近皮质的纺锤体极上^[82]。

微管和 F-actin 之间的相互作用是很多细胞学过程完成所需的,其中包括减数分裂^[114-117]。在小鼠卵母细胞纺锤体迁移过程中,肌动蛋白丝逐渐组装成一个纺锤体样结构^[53]。很多微丝沿着微管形成。微丝在微管纺锤体周围装配成一个 F-actin “巢”,在巢中也有一些微丝分布。在没有微管纺锤体的时候微丝的这种组装不会出现,比如在用 nocodazole 处理破坏微管之后就不出现 F-actin 巢式结构。因此,F-actin “纺锤体”与微管纺锤体是紧密相关联的。在爪蟾卵提取物中也观察到相似的结果^[118],肌动蛋白微丝能结合微管。例如在爪蟾卵中,myosinX 将 F-actin 与微管相关联,对于纺锤体锚定和不对称分裂是非常重要的^[60]。

MII卵母细胞皮质富含聚合的肌动蛋白丝,尤其在染色体上方的皮质分化区^[49,119]。用光漂白荧光恢复技术(FRAP)分析检测发现,皮质分化区域的微丝与其他区域的相比,量更丰富,动态变化不明显,相对稳定^[53]。该结果说明,皮质区微丝稳定性存在差别,其他研究也得到相同的结果^[49,119]。更多稳定的actin微丝在染色体附近的胞质中聚集,离染色体远的区域动态变化明显。因此,染色质周围稳定性的增加可能保证了染色体在皮质的锚定。

6. 微丝形成相关蛋白与卵母细胞纺锤体迁移

6.1 formin-2

来自formin-2缺陷的小鼠卵母细胞其染色体停留在中心,不能排出第一极体,当受精时,导致形成不能存活的异倍体胚胎^[51]。活体拍摄显微镜实验显示,敲除formin-2的卵母细胞经历后期,但是不发生胞质分裂,因此两团染色体最终又聚合形成一个纺锤体,并且是中期纺锤体,含有40个单价体而不是20个。而且,第一次减数分裂纺锤体不能迁移到皮质,染色体停留在卵母细胞中央^[15]。最近,用F-actin特异探针和活体共聚焦显微镜发现,formin-2参与组装高度动态化的F-actin胞质网络,该网络控制纺锤体的迁移^[53]。而在formin-2敲除小鼠中这个网络是不存在的^[53,54]。在第一次减数分裂的晚期,肌动蛋白丝在纺锤体周围组装成一个纺锤体样结构,通过线性肌动蛋白丝将纺锤体与皮质联系起来。在fnn2-/-卵中,皮质区肌动蛋白染色未受影响,说明Formin2不是皮质F-actin所需要的,这与过去的研究结果相一致^[15,53,54]。

6.2 myosin II

往小鼠卵母细胞中注射抗体发现myosin IIA是迁移所需要的^[62]。Myosin II在胞质分裂过程中与直线型actin微丝相作用,而在fnn2-/-小鼠卵中,具活性的磷酸化myosin II定位错误

[15]。因此,可以假定,myosin IIA参与F-actin网络所需要的收缩性从而使纺锤体定位^[14]。激活的myosinII在纺锤体极上富集,并且牵动微丝向纺锤体极移动。用肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase, MLCK)抑制剂ML-7处理小鼠卵母细胞后,这种牵拉作用停止,纺锤体也不能迁移到皮质,说明myosinII通过对微丝的牵拉作用产生牵引纺锤体移动的作用力^[54]。

6.3 CDC42

Cdc42是小GTP酶Rho家族的成员^[120],对于调控微管和微丝骨架有重要作用^[121]。CDC42在小鼠卵母细胞纺锤体迁移过程中发挥作用^[122]。在CDC42突变的小鼠卵母细胞中,纺锤体不能发生向皮质区的迁移,而是停留在中心位置,皮质肌动蛋白丝也不均匀,而在对照卵中会形成actin帽。而在nocodazole处理破坏微管的实验中,突变型CDC42也引起染色体不能向皮质迁移,actin帽不能形成。

7. 纺锤体旋转和极体的排出

破坏微丝骨架使卵子在受精或激活时纺锤体不发生旋转^[17,57,67]。小鼠卵母细胞第二次减数分裂中纺锤体的旋转研究很多。微丝对小鼠卵母细胞激活过程中纺锤体的旋转起很重要的作用^[17]。通常认为,肌动蛋白聚合抑制剂能抑制小鼠卵母细胞纺锤体的旋转^[57,123]。除微丝外,MYLK2和myosin II也涉及纺锤体的旋转^[124]。在大多数哺乳动物中,第二次减数分裂中期相纺锤体垂直于卵母细胞表面,而在小鼠成熟卵母细胞中纺锤体平行于质膜,当精子进入后纺锤体旋转90度,变成垂直于质膜从而使第二极体在卵周隙中排出。CB不影响染色体的迁移和核分裂,但是抑制纺锤体的旋转和胞质分裂。结果,染色体不能正常分配到第二极体而留在胞质中,转变成另一个原核。当把CB的作用时间激活后延长3h,纺锤体的旋转将不可逆的被抑制。这有可能是因为在纺锤体旋转和极体排出的关键时期CB解聚了微丝所导致。Navarro 等^[57]在小鼠卵母细胞研究中也发现,细胞松弛素D也抑制了纺锤体旋转。Jasplakinolide是一种促进微丝聚合和稳定的药物,作用与CB相似,也抑制卵母细胞成熟和极体的排放^[125]。不管是促进微丝聚合的药物还是抑制聚合类药物,都破坏了微丝组装和解聚的动态平衡关系,从而导致纺锤体的旋转和极体的排放均被抑制。这些结果显示,纺锤体的旋转对极体的排放非常重要,并且微丝控制着减数分裂纺锤体的旋转。

尽管目前已经证明微丝在卵母细胞成熟过程中的纺锤体迁移、极性建立、不对称分裂等事件中起作用,但是对其在这些事件中的详细作用机制了解的还不够深入。对于卵母细胞成熟过程中,微丝、微管、中间纤维三者靠何种机制协同发挥作用也不了解。因此,对

卵母细胞内肌动蛋白准确的组装和动力学变化还需要进一步研究, 以便了解微丝在卵母细胞不对称分裂中的协调作用。

三、Rho家族蛋白与卵母细胞减数分裂

卵母细胞的减数分裂是极度不对称的。细胞分裂时时间和空间上的控制保证了两组染色体的准确分离。在很多物种中这种不对称分裂有赖于减数分裂纺锤体的偏中心定位, 还需要卵裂沟限定在染色体上方的胞质区。对小鼠和爪蟾卵母细胞的研究表明, 小GTPase, 如CDC42、Rac、Ran等都参与控制纺锤体的组装和定位。

1. Rho和Ran家族蛋白

Rho 蛋白家族属于Ras 超家族(包括Ras, Rho, Rab, Ran和Rrf家族) 的小GTP 结合蛋白, 其分子量在20~30 KD之间, 在所有的真核细胞当中作为分子开关控制着众多信号转导途径^[126]。Rho蛋白在细胞的信号转导通路中作为信号转换器, 作用于细胞骨架或靶蛋白而产生多种生物效应, 如调控各种细胞骨架运动、细胞形态建成、细胞周期、基因转录和超氧阴离子的产生等^[127]。目前Rho蛋白最明确的功能是引起F-肌动蛋白的重组和动态变化^[128], 但是在该通路中Rho蛋白活化及其信号传递机制还不是很清楚。Rho蛋白可归纳为3个不同的亚类: Rho, Rac和Cdc42^[129]。

Rho蛋白和其他的小G蛋白一样, 具有保守的GTPase结构域、GTP/GDP结合域和效应物结合域^[130]。Rho蛋白在前两个结构域的参与下, 与GTP/GDP精确的相互作用, 水解GTP; 通过效应物结合域与下游效应因子相互作用, 向下游传递信号, 另外Rho蛋白还有一个经翻译后修饰的C末端, 这个脂质末端与一些调节因子以及膜结构相互作用, 如细胞膜、包涵体和高尔基体等^[131]。

Rho蛋白在细胞内与GTP和GDP有高度的亲和力, 并且具有低水平的内在GTPase活性^[132]。这种与GTP和GDP结合状态间的平衡主要受3 类细胞因子的调节:

①鸟苷酸交换因子(guanosinenucleotide exchange factors, GEFs), 可以促进GTP 取代GDP使Rho蛋白激活。在动物细胞中大部分Rho GEFs 含有DH 结构域(Dbl-homology domain, DH), 其后接PH 结构域(pleckst rin homology domain, PH)。DH 结构域的主要作用是催化GDP/GTP 的交换反应及调节Rho 的活性; PH 结构域则通过与脂质结合调节Rho GEFs 在细胞内正确的定位, 有研究证明与PH结构域结合的脂质配基还直接影响DH 结构域的活性^[133]。

②GTP酶激活蛋白(GTPase activating proteins, GAPs), 在Rho GAP存在时, Rho蛋白内

在的GTP酶活性得以提高,更易于与GTP分离并结合GDP转变为失活状态。这些Rho GAP蛋白分子具有一个被称为精氨酸指状结构的保守结构域,它插入Rho GTPase的活性位点,激活Rho蛋白的GTP酶活性,点突变也证明了精氨酸在这个过程中重要作用^[134],但是精氨酸不影响GAP蛋白与底物的结合。

③GDP解离抑制因子(GDP dissociation inhibitors, GDIs),阻抑GDP与Rho蛋白的分离,通过与Rho蛋白的结合使之存在于胞质中,调节Rho蛋白在细胞内的定位。Rho GDIs具有双重功能,即当Rho GDIs以溶解状态存在于细胞质中时,与GDP结合形式的Rho蛋白形成复合物,阻遏Rho蛋白从GDP结合形式转变为GTP结合形式;当位于质膜上时,Rho GDIs与GTP结合形式的Rho蛋白相互作用,阻遏GTP的水解^[135]。核磁共振和晶体结构研究认为,GDI和Rho蛋白通过一个免疫球蛋白样C末端结构域相互作用,同时GDI一个可变的N末端结构域则阻遏GDP和GTP的交换^[136]。

CDC42和Rac通过激活肌动蛋白成核因子Arp2/3促进肌动蛋白聚合,Arp2/3的激活引起微丝分支的形成。Rho蛋白与另一种肌动蛋白成核因子formins相作用,促进直线型微丝的形成。

有研究报道,在进化上保守的极性蛋白Par3和Par6在小鼠卵母细胞中也有表达,并且在皮质区MII纺锤体的上方富集^[137,138]。Par3、Par6和aPKC组装成一个多蛋白复合物,在多种细胞的极性形成和维持方面发挥关键作用^[139]。人们认为Par复合物在哺乳动物细胞中的不对称定位是由Par6与活化状态(GTP结合)的Rac1或Cdc42相结合介导的^[140]。

Ran蛋白与GTP相结合时活化,与不同的下游效应分子相互作用进而执行不同的生理功能;具有GTP水解酶活性,催化GTP水解后与GDP结合而失活。其中,GEF催化GTP对GDP的置换,GAP激活小G蛋白的水解酶活性。研究表明,Ran蛋白与其它小G蛋白一样,在信号转导通路中起到分子开关的作用。

Ran GTPase和它的调控因子——Ran结合蛋白(RanBPs)、Ran鸟核苷酸交换因子(RanGEF)RCC1和RanGTPase激活蛋白(RanGAP)共同作用,在细胞核质间运输及有丝分裂周期中起着重要的调控作用。

RanGAP集中在核孔复合物的胞质面,RCC1与染色质相结合;在细胞分裂间期,Ran GTPase以GDP结合的形式存在于细胞质中,以GTP结合的形式存在于细胞核中。细胞核中的Ran-GTP能与核孔运入复合物、运出复合物相结合,改变复合物的构象,使含核定位信号的分子从运入复合物中释放到细胞核中或使含核输出信号分子结合在运出复合物上运到细胞质中,这就决定了这些物质在核质间的运输方向及分布^[141]。

在细胞分裂期间，RCC1从细胞核中释放，引起细胞质中RanGDP向RanGTP的转换，RanGTP结合到细胞质中的运入复合物，使得核定位信号分子释放到细胞质中，这些物质往往调控着重要的细胞周期事件，例如从含RanGTP的运入复合物中释放的NuMA直接控制了极微管的形成及其对着丝粒的正确捕捉^[142]。此外，Ran蛋白是核膜重建和DNA复制启动所必需的^[141]。

2. 卵母细胞中Rho GTP酶和Ran GTP酶的活性

在M期，微管在Ran GTP酶作用下在染色体周围组装^[143,144]。当RanGAP在胞质中时，鸟苷酸交换因子 RCC1在染色体周围聚集。这样，具活性和不具活性的蛋白在空间上分隔开来，在爪蟾中，卵细胞和体细胞中就出现了RanGTP的梯度，离染色体越近浓度越高，离染色体远的区域浓度低^[71,145,146]。

在小鼠卵母细胞中，用基于FRET的探针进行标记证明存在RanGTP梯度^[52]。跟爪蟾一样，染色体周围RanGTP浓度很高，随着离染色体距离越远浓度逐渐降低。这种局部RanGTP的积累伴随着染色体向皮质区的迁移，提示RanGTP可能为纺锤体在细胞内的定位提高空间线索^[52]。

Halet和Carroll^[72]用特异结合RacGTP的荧光探针进行研究发现小鼠卵母细胞中有活性Rac。在纺锤体还没开始迁移的未成熟小鼠卵母细胞中，RacGTP均匀的分布在皮质区。当纺锤体向细胞皮质迁移时，活性RacGTP局限在纺锤体上方微丝聚集区，然后进入极体。第一次分裂完成后，活性Rac在MII纺锤体上方皮质积累，这种积累与微管的存在无关^[72]。这一观察结果显示，减数分裂染色体发出一个信号，启动RacGTP在其周围的积累。由于这种积累是一种远距离效应，不需要染色体和皮质之间的直接接触，因此可以推测染色体周围也有以染色体为中心的RacGEF梯度，导致Rac在染色体附近的激活。而且在注射Rac的显负性突变体后，肌动蛋白仍然能够在皮质聚集，说明Rac的局部活化不参与皮质极化过程^[72]。在小鼠卵母细胞中，染色体的位置代表了RanGTP梯度的存在，它们位于皮质的位置诱导了局部RacGTP的积累。需要进一步研究的是皮质RanGTP梯度和RacGTP的局部活化是否存在直接联系。在爪蟾卵母细胞中，活性CDC42和RhoA在MI期时在纺锤体上方区域聚集，与小鼠卵母细胞中RacGTP的积累相似^[147]。不过，人们推测RhoA和CDC42的局部积累可能需要纺锤体微管^[147]。

3. 在纺锤体形成和定位中的作用

在多数细胞中，纺锤体的组装需要两种行为协同作用：追踪捕获和局部组装。追踪捕获依赖于中心体活性，中心体诱导微管从纺锤体极的组装。局部组装依赖于小RanGTPase，

微管从染色体开始组装。小鼠和爪蟾卵母细胞没有中心体，因此在这些模型中，减数分裂纺锤体可能通过局部组装机制组装^[148-150]。不过出乎意料的是，在小鼠和爪蟾卵母细胞中，即使没有RanGTP梯度的存在，MI纺锤体也能形成^[52]。而且，对卵母细胞中纺锤体形成时RanGTPase的作用进行分析发现：MII纺锤体的形成对RanGTP梯度的敏感性远远高于MI纺锤体的形成。这可能与MI纺锤体形成比MII纺锤体形成慢有关。因此，在这两个过程中Ran-GTP依赖的机制可能受到不同方式的调控。另一方面，当去除小鼠卵母细胞中的染色体时，MTOCs和微管能够自我组装成一个双极结构^[55]。因此，这种不依赖于Ran-GTP的自我组装机制可能在第一和第二次减数分裂过程中发挥作用^[16]。Ran-GTP的一个下游效应物TPX2诱导染色体周围Ran-GTP依赖的微管组装^[151]。在小鼠卵母细胞减数分裂过程中，TPX2的水平受到严密调控，前期几乎没有，在第一次减数分裂开始的时候开始积累，一直到MII期都存在。而MI纺锤体和MII纺锤体组装的时间正好处于TPX2高水平期^[16]。因此在MI纺锤体形成时即使没有RanGTP梯度存在纺锤体也能够组装，而RanGTP的一个效应分子TPX2可能起关键作用。

在小鼠卵母细胞成熟过程中用Rac和Cdc42的显负性突变体导致MI纺锤体的延长，使得同源染色体不能有效分离^[72,122]。显负性Rac诱导纺锤体延长及染色体分散^[72]，而显负性Cdc42只诱导纺锤体延长^[122]，说明这两个分子的目标分子不同。Cdc42的显负性突变体和长期保持活性的突变体的表达引起纺锤体向卵母细胞皮质区的迁移受到抑制。

4. 皮质分化

染色体能够诱导皮质分化。在爪蟾卵母细胞中，显负性Cdc42抑制第一极体排出。出现这种现象是因为MI纺锤体上方只有异常的低水平actin积累。因此在这个模型中，Cdc42可能是极体排出前皮质分化所需要的^[147]。在小鼠卵中，抑制Cdc42引起纺锤体延伸，并且抑制纺锤体的正确定位。

将包被DNA的颗粒注射到MII期胞质中，引起肌动蛋白和磷酸化myosinII的局部积累，这在正常情况下由染色体诱导^[152]。该研究还发现，与DNA包被颗粒相关的活性以剂量和距离依赖的方式起作用。最终该研究证明，RanGTP是染色质诱导的皮质分化所需要的。将DNA包被颗粒和失活状态Ran（RanT24N突变体）共同注射到胞质中时，纺锤体能够形成，但是不能诱导皮质分化。由于皮质分化与分裂沟的形成和极体的体积有关，因此这些结果与另一个实验结果相一致：将表达RanT24N的MII卵母细胞用镉离子激活时，卵子均等分裂而不能排出第二极体^[52]。一种可能性是RanGTP对于维持MII纺锤体在皮质的锚定是必要的。另一种可能是覆盖于染色体上方的分化区域对于限制分裂沟的进程是必要的但对于

分裂沟的起始不是必需的。最终,在第二次减数分裂过程中,RanGTP水平的提高或降低对MII纺锤体和皮质分化产生相似的效应,这说明在MII期,RanGTP梯度的存在对于维持正常的双极纺锤体组装和及其上方的皮质分化区域都是必要的^[52,152]。MII期卵母细胞过表达无活性Rac抑制纺锤体锚定和第二极体的排出,但是不会影响已形成MII纺锤体的组装^[72]。基于在MI和MII卵中过表达失活的Rac结果,可以推测Rac调控纺锤体在皮质的锚定,但是不调控肌动蛋白帽的形成,actin帽的形成可能依赖于RanGTP梯度的存在。

5. 极体排放

在脊椎动物卵母细胞极性建立和不对称分裂过程中,Cdc42、Rac1具有重要作用。卵母细胞分裂期收缩环(contractile ring)的形成并完成收缩是卵母细胞释放极体的关键。收缩环是由大量平行排列的微丝组成,随着收缩环收缩,胞质发生分裂,形成并释放极体。爪蟾卵母细胞极体的形成需要Cdc42的参与^[147]。在爪蟾卵母细胞不对称分裂过程中,Cdc42通过调节F-actin的活动完成胞质分裂和极体释放。在注射了Cdc42T17N (dominant negative Cdc42, 显负性Cdc42)的爪蟾卵母细胞中,染色体能完成分裂的过程,但是极体释放失败,未见明显的F-actin聚集且没有形成收缩环,可见Cdc42在调解F-actin聚集及之后的收缩环形成过程中起作用^[147]。Cdc42在正在成熟的小鼠卵母细胞的不对称分裂过程中也发挥重要作用^[153]。Cdc42表达的沉默破坏了纺锤体微管和肌动蛋白丝的分布,并使第一极体排出率降低。突变型Cdc42的表达完全抑制第一极体的释放。Cdc42的显负性突变体和长期保持活性的突变体的表达引起纺锤体的伸长,并且向卵母细胞皮质区的迁移受到抑制。纺锤体的延长和极体排出的抑制也在抑制Rac1活性的小鼠卵母细胞中观察得到^[154,155]。Cdc42和Rac1与下游效应物PAK1 (P21-activated kinase 1)相作用,对于小鼠卵母细胞减数分裂过程中纺锤体组装和染色体排列有重要作用^[156]。用Cdc42的抑制剂处理小鼠卵母细胞改变极性相关蛋白IQGAP1在细胞中的分布,抑制极体的排出,引起皮质肌动蛋白的弥散^[157]。

用ROCK(Rho-associated kinase)的特异性抑制剂处理过的卵母细胞无法排出第一极体和第二极体。这是由于ROCK活性的下降,上调了丝切蛋白的活性,促进微丝解聚^[158]。有丝分裂细胞中,收缩环的组装是由RhoA GTPase调节的,RhoA GTPase 激活myosin和肌动蛋白丝的组装^[159]。在小鼠卵母细胞中,用RhoA 激酶(ROCK)特异性抑制剂Y-27632处理和显微注射RhoA抗体能引起微丝组装异常,从而抑制第一极体和第二极体的排放^[158]。

四、多倍体胚胎的研究及应用

多倍体发育现象在低等动物,尤其是在两栖类、爬行类、鱼类等无脊椎动物中普遍存在,而哺乳动物多倍体在自然界中是一种染色体畸型,其自然发生率非常低。大多数多倍体往往发育到胚胎早期就死亡了,因此在自然界中很少存活^[160]。人工制作多倍体的方法在植物界广泛应用,并且得到了许多新品种,而得到多倍体哺乳动物却非常困难,可能性很小。如果通过改进技术能够使哺乳动物四倍体胚胎发育并参与完成妊娠,对哺乳动物新型生物技术的研究与开发具有重要的意义。利用构建四倍体囊胚并使其参与到克隆动物的研制,可能部分解决克隆动物胎盘肥大等异常问题,提高克隆效率。四倍体胚胎也是研究和验证诱导干细胞(iPS)的重要途径。但是如何在实验条件下,获得大量稳定的四倍体胚胎成为研究的关键。

1. 动物中的多倍体现象

多倍体发育现象在植物界以及无脊椎动物中普遍存在,但在哺乳动物中多倍体经常在胚胎发育的早期或者出生后不久就死亡了^[161,162]。在低等动物中,如甲壳类中的一种丰年鱼为四倍体;线形动物中的马蛔虫为同源四倍体($4n=4$)。昆虫中的多倍体现象又总是与孤雌生殖方式联系在一起。昆虫种类估计在 250~300 万种,而已知的多倍体昆虫不足百种。鱼类、两栖和爬行类中,根据细胞学观察和 DNA 含量、重复基因位点的分析,证实在鱼类、两栖和爬行类中存在着多倍体类型。在哺乳动物中,全部由多倍体细胞组成的动物尤为罕见,但是许多二倍体动物在它们身体的某些组织内,拥有多倍体细胞。

科学家对哺乳动物四倍体胚胎发育能力进行了大量的研究。1973 年, Snow 等^[163]用细胞松弛素 B 制作小鼠四倍体胚胎并移植成功获得 3 个四倍体小鼠,但以后再没有人能够重复出他的实验结果^[164]。因此,人工诱导获得的四倍体胚胎能否发育到妊娠足月仍然具有争议。但是,在自然界中却存在能够正常发育的四倍体哺乳动物,阿根廷红维士卡奇鼠(*Red Viscachrat, Tymanoctomys barrerae*)($4n=102$)^[165]有 51 对染色体,而同科其他种鼠类只有 26 对染色体,其细胞内 DNA 含量比其他鼠多一倍,精子头部很大;可能在其 51 对染色体中,常染色体是四套,而性染色体是两套,从而保证了生殖在四套染色体生物间进行。

自发形成四倍体的机率非常低。小鼠自然发生的机率仅有 0.1%^[166,167],染色体不正常造成自发流产的胎儿中约有 1.1~7.1%是染色体加倍造成的^[168-171],表现为只有胚外组织而没有胎儿本身。人工诱导四倍体技术已经成为实验室的常规技术,为研究染色体加倍后生命活动现象提供了宝贵的材料。但是,迄今为止,极少得到四倍体动物。然而,当四倍体

胚胎细胞与一定数量的二倍体胚胎细胞进行嵌合的时候，四倍体胚胎细胞表现出向胚外组织发育的倾向性分布的特点^[172]，具体原因需要进一步研究。

2. 四倍体胚胎的获得

四倍体胚胎作为一种研究机体发育的有力工具，有必要人为制作大量的四倍体胚胎。目前，在实验室中，制作哺乳动物 4n 胚胎的形成通常主要通过生物法、化学法、物理法来制备。

2.1 细胞核移植法

制作四倍体胚胎最直接的方法就是通过显微注射，即把一个二倍体(2n)胚胎的细胞核直接注入到受精卵中，这样发育而来的胚胎就是 4n 胚胎^[173]。这种方法最初应用在兔子上，随后在小鼠上作为一种研究 ICM 细胞和滋养层细胞发育潜力的工具。利用这种方法来制备四倍体胚胎，对操作技术要求较高，同时显微操作对胚胎损伤较大，仅有 9%-15%的胚胎能够发育到囊胚^[173]。

2.2 抑制卵裂球分裂法

这种方法是抑制卵裂球细胞的细胞质分裂而不影响染色体复制和卵裂球继续分裂，因此使 DNA 的量在一个细胞中加倍，从而形成 4n 胚胎^[163]。一般采用细胞松弛素 B 和秋水仙素等化学试剂处理 2-细胞或者 4-细胞卵裂球来生产四倍体胚胎。Snow 将 2-细胞期胚胎在细胞松弛素 B 中处理培养，60%左右的胚胎成为四倍体胚胎，其中 40%-75%能发育到囊胚^[163]。随后，很多科学家都利用这种方法获得了四倍体胚胎。但是，这种经过化学方法处理来制备四倍体的方法，很难避免化学试剂的毒性带来的对胚胎发育造成的不良影响，甚至延迟阻滞胚胎的发育。另外，这种方法很难避免卵裂球的不同质性，即一个卵裂球经过处理变成四倍体了而另外一个或者几个没有同时变为四倍体，这种嵌合体存在的机率高达 20%以上^[174]。

2.3 细胞融合法

第三种制作四倍体胚胎的方法是卵裂球融合法。这种方法是通过化学或者物理的手段使卵裂球的两个细胞融合成为一个细胞达到染色体加倍目的的。化学药物如聚乙二醇(PEO)、仙台病毒和电击等都能使卵裂球融合。仙台病毒是最早用来诱导细胞融合的一种方法^[175]，其原理是通过促融合因子作用于细胞膜使细胞凝聚并融合而产生四倍体胚胎^[176]。但这种方法必须在 2-细胞阶段进行融合，而且要去掉透明带，也存在潜在的致病性，而且一次只能操作一枚胚胎，效率很低，难以大量得到四倍体胚胎。聚乙二醇可与水分子借氢键融合，导致细胞脱水而发生质膜结构的变化而引起细胞融合。但这种方法对细胞损伤

较大, 残存有毒性等缺点^[177]。电融合的原理是在紧密相连的卵裂球接触面上垂直施加一定强度的脉冲, 在短时间内使细胞质膜发生可逆转性的电穿孔, 相邻的卵裂球细胞膜发生融合, 从而染色体加倍后即可得到四倍体。这种制备四倍体的方法原来在植物中应用^[178]。电融合过程中, 务必使 2-细胞胚胎中两个分裂球的接触面与电场方向垂直, 这样才可获得较好的融合效果。克服了潜在的化学试剂的毒害和病毒致病性的干扰, 而且对胚胎细胞损伤较小, 胚胎发育能力更强, 已经成为制作四倍体胚胎最常用的方法。有关小鼠的研究结果证明, 采用 2-细胞期胚胎电融合法制备的融合胚胎全部是四倍体胚胎, 不存在 $4n:2n$ 嵌合体现象^[179,180]。

3. 四倍体胚胎的发育能力

有关小鼠四倍体胚胎发育最早的报道是 Snow 使用细胞松弛素 B 制备小鼠四倍体胚胎, 将 112 个四倍体胚胎移植到 24 只假孕母鼠受体内, 其中 14 只妊娠, 共发现 78 个着床点, 检测发现其中 67 个着床点的胚胎发育受阻, 未能发育到器官分化, 另外 11 个胚胎均能发育到妊娠后期, 并有 2 只出生^[163,181]。但以后均没有人能够重复他的实验结果。因此, 人工诱发的四倍体胚胎能否发育到妊娠足月尚有争议。后来, Tarkowski 等使用同 Snow 同样的技术, 没有生产出存活的四倍体胚胎, 都在妊娠 10 天以前就流产了, 大部分胚胎在 8d 就开始表现出神经方面的缺陷^[182]。在四倍体兔子中也出现了类似的结果^[183]。某些成年哺乳动物的胚外组织中即使检测到了一些多倍体细胞, 然而绝大多数哺乳动物的组织发育与四倍体现象是不相容的。小鼠四倍体胚胎通常只能发育到原肠形成前期, 少量可以发育到原肠后期, 最终流产不能发育为成年个体。

4. 小鼠四倍体胚胎的细胞学效应

四倍体现象可以导致胚胎细胞在某些生物学特性上发生改变。1992 年, Henery 等对电融合后获得四倍体胚胎的研究显示, 其囊胚大小约为正常二倍体胚胎的 85%, 但细胞数略少于后者的一半, 细胞核大小约为二倍体胚胎的两倍^[184]。1995 年, Koizumi 等发现其四倍体胚胎细胞的平均细胞周期为 14.03hr, 较正常二倍体胚胎的 12.02hr 略延长, 胚胎致密化出现 hCG 注射后 72hr, 即 4-细胞后期, 囊胚腔约出现于 hCG 注射后 96hr, 即 32 细胞期左右, 分别对应于同品系二倍体胚胎的 8-细胞后期与 64-细胞期^[185]。小鼠四倍体囊胚期平均细胞数目大约是二倍体囊胚期胚胎的一半左右脚; 大鼠的研究中也发现: 虽然四倍体和二倍体包含的细胞数目差异很大, 但是在胚胎的发育上却基本一致, 两者在胚胎致密化和囊胚腔出现的时间上几乎一致, 而且胚胎的体积也没有明显的差异^[186], 由此, 对照二倍体细胞体积我们可以粗略估计出四倍体细胞的体积大小。在细胞的发育周期上, Koizumi^[185]认

为四倍体细胞发育周期比二倍体细胞缩短了 2 个小时。

5. 四倍体胚胎的基因表达

有关哺乳动物四倍体细胞基因表达的研究表明：四倍体的形成并没有使细胞蛋白质和 RNA 的表达水平加倍，在植物和其他物种上的研究也发现了类似的结果。小鼠四倍体桑堪胚中总 RNA 和苹果酸脱氢酶的水平分别是对照组的 1.5 倍^[187]，而源于人类四倍体流产儿的成纤维细胞系表达的酶活性明显低于正常的二倍体细胞系。

实验证明，胚胎分裂球融合后，两套结合在一起的基因组并没有在同一水平上表达各自的基因，将两个分别源于 129/sv 和 C57BU6 小鼠的胚胎分裂球点融合后，测量各自的 ePI (GlucosePhosphateIsomerasePx, 葡萄糖磷酸异构酶) 表达水平，结果发现：两套融合在一起的基因组的 GPI 表达水平不同^[188]，在后续发育中，两种不均等表达现象更为明显。这些研究结果表明：四倍体胚胎并没有简单的使细胞以及包含的成分加倍。多倍体现象是机体许多细胞发挥正常功能所必需的，但这同时又不利于其他细胞功能的发挥。

6. 四倍体发育异常的原因

科学家对哺乳动物四倍体胚胎发育能力进行了大量的研究，四倍体早期胚胎细胞染色体核型不正常、囊胚细胞数少、细胞相对较大被认为是影响其正常发育的原因^[189,190]，但确切的机制仍然不清楚。染色体加倍以后会产生很多冗余的基因，发生基因突变、染色体修饰等，从而导致基因组的不平衡。其中，印迹基因在基因组平衡中起着非常重要的作用，印迹基因的表达发生紊乱，对胎儿的正常发育、特别是胎盘的发育是非常不利的^[191,192]。众所周知，孤雌胚胎在发育过程中，胚外组织不能正常发育并最终流产就是由于印迹基因 H19 与 Igf2 表达发生紊乱而导致的。2004 年，Kono 领导的研究团队使印迹基因 H19 和 Igf2 在孤雌小鼠胚胎中的表达达到相对平衡后而得到了成活的孤雌小鼠，从而进一步证明了这一点^[193]。因此可以推测，四倍体胚胎不能正常发育，也可能是由于 H19 和 Igf2 等印迹基因在胚胎发育的囊胚阶段的异常表达造成的。

7. 四倍体胚胎的应用

因 4n 细胞独特的组织分布方式，以及 ES 细胞与 4n 胚胎具有明显的发育互补性，使得 2n-4n 嵌合技术成为研究胚胎发育中胎儿与胚外组织基因功能的重要手段。特别当采用 ES 细胞介导中靶突变时，携有突变细胞的动物(或胚胎)将会出现一定的表型性状，借助表型分析，我们有可能对机体内各种生化径路中相关基因的功能与调控问题进行系统的研究。

目前，四倍体胚胎最重要的用途是用于 ES 细胞和 IPS 细胞的四倍体补偿实验。正常胚胎的胚外组织包含大量多倍体细胞，如滋养层巨细胞和合体滋养层细胞，体积较大的细

胞容易聚集在滋养外胚层来源的各种组织。四倍体细胞具有发育为胚外组织的趋势,胚外组织比胚胎组织环境可能更有利于四倍体细胞的生存。将具胚胎组织发育多能性的 ES 细胞导入具胚外组织发育潜能的四倍体胚胎构建成嵌合体早胚,移植入母体后获得了胚胎全程发育(四倍体囊胚互补技术)。四倍体胚胎与 ES 细胞发育潜能具有相反性或者说是互补性,而利用这种相反性或者互补性就可以克隆出完全由 ES 细胞发育而来的动物。其中四倍体胚胎细胞仅参与卵黄囊内胚层和胎盘滋养层细胞谱系(绒毛膜外胚层细胞、滋养层细胞)的生成,ES 细胞广泛参与胚体、尿囊和卵黄囊中胚层及绒毛膜中胚层的生成,而不参与参与卵黄囊内胚层和胎盘滋养层细胞谱系的生成^[194]。因此用胚胎干细胞(ES)和 4n 细胞聚合形成嵌合体后获得完全由 ES 细胞来源的研究中,四倍体细胞是非常有优势的^[195-196]。在最近的研究中,四倍体囊胚成功的作为中间受体用以获得存活的小鼠 IPS 细胞来源的后代^[197,198]。四倍体补偿技术绕过了嵌合体小鼠阶段,与二倍体嵌合体制作过程相比,ES 细胞与四倍体囊胚互补促进了复杂的转基因或基因突变小鼠在短期内产生。该技术是快速生产纯和基因修饰 ES 细胞小鼠的有效方法。

在所有调控胚胎发育的功能基因中,有一类控制胚胎着床及胚外组织发育的基因,当它们发生突变时,由此形成的胚胎会丧失着床及着床后发育的能力。以正常的 4n 胚胎与这类存在缺陷的胚胎(2n)聚合后,有可能对后者的致死表型加以拯救,使之完成着床及后续发育,从而最终获得存活动物。

在对哺乳动物囊胚滋养层的分化、演变过程中一些转录因子及细胞因子的功能研究方面,2n-4n 嵌合技术具有其独到的优势与作用。通过这种特异的“4n 胚胎拯救法”,Guillemet 首次阐明了 Mash-2 基因在哺乳动物胚胎胚外组织发育中的关键作用^[199]。

此外,针对克隆动物生产中的胎儿巨大症(large offspring syndrome, LOS)以及胎盘异常等引起的效率低下现象,通过将四倍体胚胎与普通克隆胚胎或普通克隆胚胎的内细胞团聚合,经移植后在很大程度上改善了胎盘异常等问题,克隆效率得到明显提高^[200]。以 4n 胚胎与核移植重构胚所衍生的 ES 细胞系(或类 ES 细胞系)组合 2n-4n 聚合胚,可以对重构胚因印记基因异常所致的胚外组织发育异常加以拯救,从而可提高重构胚的着床及着床后的发育率,故而提高整个克隆的效率,由此也可以高效地获得转基因的克隆动物。

五、卵母细胞极性与胚胎发育和体细胞重编程的关系

前已述及,哺乳动物的卵母细胞存在极性^[201],这种极性可能影响其后的胚胎发育。在正常受精过程中,精子在卵母细胞的特定区域受精。因此,在一些胚胎生物技术中,如胞质内精子注射(ICSI)、动物和转基因动物克隆中,充分考虑到卵子存在的极性现象,对于提高这些操作的效率是有效的。

1. 卵母细胞极性与胞质内精子注射(ICSI)

动物的卵子由动物极和植物极组成。在低等动物中发现,如果将卵的细胞核从其最初的位置转移到其他位置,会导致胚胎发育的异常。Antczak 和 Van Blerkom^[201]等基于对 leptin 和 STAT3 分布的研究表明,哺乳动物卵母细胞也分两个半球。第一极体位于动物极半球, leptin 和 STAT3 主要分布在该半球。动物半球对面也就是植物极半球中各种胞质细胞器的量多于动物极^[202,203]。这些形态上有差异的区域如何起功能性作用、是否与卵子操作的成败有关呢?

在 ICSI 操作中,精子进入卵子的位置对其后期结果很重要,将精子注射到卵母细胞动物极能够获得质量好的胚胎^[204]。ICSI 过程中精子注射的位置与预测的纺锤体位置的远近能够影响受精和高质量胚胎的发育。处于第二次减数分裂中期(MII)的哺乳动物卵母细胞,通常以第一极体的位置来确定 MII 纺锤体的位置。但是,在实验条件下,由于操作手法与操作时间的原因,往往造成 MII 卵母细胞第一极体的位置的变化。因而,第一极体的位置并不足以用来判断 MII 纺锤体的位置^[205]。有人作过统计,在临床上,90%以上的人 MII 卵母细胞的纺锤体并不紧邻 PB1,二者之间往往形成大小不一的夹角^[206]。当基本确定纺锤体位于 PB1 附近时,将极体置于 11 点的位置进行精子注射时能够获得更高的受精率、胚胎发育率和植入率^[207,208]。当在人卵母细胞极体上方的透明带上开口时,出现的多精受精率明显高于在极体对面半球开口。但是在小鼠中与此相反。小鼠的卵子受精时精子很少穿透动物极。在小鼠中,动物极覆盖的微绒毛比植物极少,而且,覆盖于纺锤体上方的区域没有微绒毛^[49]。可能这个无微绒毛区域对精子穿入起到生理屏障的作用。不过可以想象,小鼠精子穿入位置如果紧挨着卵母细胞第二次减数分裂纺锤体可能导致异常的卵子-精子融合、第二次后期/末期染色质分离缺陷以及最终胚胎倍性异常。

2. 卵母细胞极性与核移植

体细胞核移植(somatic cell nuclear transfer, SCNT)是指将高度分化的体细胞在移入去核卵母细胞胞质中后,在各种重编程因子的作用下关闭分化细胞特定表达的基因,开启胚胎

正常发育所需的相关基因,从而使其类似于合子基因组,获得发育的全能性。虽然体细胞克隆在多种动物中获得成功,但是克隆效率低成为目前困扰该项技术进行实际应用的最大限制因素^[209-211]。核移植中体细胞的重编程要在供体细胞转入和合子转录这样短暂的时间间隔中发生。核重编程过程包括染色体结构重建、DNA 甲基化、组蛋白乙酰化、印迹基因表达、端粒长度恢复、X-染色体失活等^[212-218]。整个重编程过程不发生 DNA 序列的变化,主要发生表观遗传修饰的改变,转变供体细胞核的基因表达模式。越来越多的证据表明供体细胞核的异常表观遗传重编程(epigenetic reprogramming)可能是导致克隆失败的主要因素。

植入核的重编程是否彻底,是与受体卵母细胞胞质密切相关的。卵母细胞是动物体中极为特殊的一类细胞,可以使高度凝集化与修饰化的精子的核去致密化并发育成原核状态,与卵原核一起形成合子,产生一个新的生命形式。高度分化的体细胞核进入卵子胞质后,也能使前者进入生命的原始状态,指导克隆胚胎发育到期。因而,卵子胞质是一个尚无破解的谜。核之重编程,供体核和受体卵胞质之间的相互协调很大程度上应该取决于卵胞质的状态^[219,220]。卵母细胞中相关物质的极性分布可能影响体细胞核移植的重编程从而影响其后的胚胎发育。核移植一般以 MII 期卵母细胞为胞质受体。核移植包括第二次减数分裂纺锤体的去除和一个细胞(包括胞质和核)的移入,从而胞质被重建。去核过程通常是把成熟卵母细胞的 MII 纺锤体和其周围的少量胞质一同去除,由于第二次减数分裂纺锤体定位在动物极,因此去核过程有选择性地去除了动物极大量胞质。胞质的去除量根据方法及操作熟练程度的不同可达 5%-50%之间,相应于失去同等比例的胞质因子,这些因子可能对重编程是非常关键的^[221,222]。

前已述及,染色体能够诱导皮质重组^[71],并且这种诱导作用具有距离效应。这个效应取决于小 GTPase RAN。在小鼠卵母细胞成熟过程中 Ran-GTP 以染色质为中心呈梯度分布^[15]。如果这个梯度发生变化那么染色体或染色质包被颗粒周围不能出现皮质重组^[70],证明 RAN-GTP 在这个过程中起主要作用。RAN 的下游分子 RAC 均匀的分布于卵母细胞皮质,但是其 GTP 结合的活性形式只发现于重组区域,RAC 的激活完全取决于附近染色质。这些结果提示在卵母细胞极化过程中,染色体周围可能募集了更多与体细胞重编程有关的物质和因子,在核移植去核过程中,这些因子随染色体一起被去除了。

上述提及的物质与因子只是作为一些研究过的例子,但是这些因子是否对外来核的重新编程起作用,目前无实验证据。但是这些活若干未知因子的去除是会对克隆胚胎的质量造成影响的。与卵母细胞核相关的母源物质的存在可能在供体核的重编程过程中发挥作用^[223,224]。为了验证卵母细胞核物质存在对克隆胚胎的发育产生影响,我们设计了被称之为“反

向核移植操作”的程序。初步结果表明，卵母细胞的核的确有助于供体细胞的重编程，而且有助于重编程的物质是极性分布的，即可能与染色体相关联或者在染色体周围呈梯度分布。

3. 反向核移植

核移植一般顺序为先去核再移核，然而反向核移植 (reverse nuclear transfer, RNT) 方法是先把供体细胞核移入完整卵母细胞后，再进行卵母细胞的去核。该方法用于多项研究以提高克隆效率。Munsie 等 (2002)^[225]用 piezo 辅助的显微注射方法将颗粒细胞注射到完整 MII 小鼠卵母细胞胞质中，然后在 2h 内去除卵母细胞的中期核，卵母细胞继续激活至 5h。这一方法明显提高了显微操作卵的存活率，并支持胚胎发育到囊胚期。Verma 等 (2002)^[226]将胎儿成纤维细胞与猪卵母细胞融合，同时进行激活，然后在 4-6h 内去除卵母细胞的核，与传统方法相比，该方法得到较高的囊胚发育率。Peura 等 (2003)^[227]将反向核移植法与无透明带技术相结合应用于绵羊。结果表明，反向法与正向法相比，前者的囊胚率显著高于后者。根据人类 MII 卵母细胞的纺锤体处于与第一极体相邻半球的卵母细胞质内的特点，将供体细胞在去核前核移植到卵母细胞内与极体相对的位置，然后对卵母细胞进行活化处理。待出现原核样核后，根据两个原核样结构与第一极体的相对位置不同来区分雌原核与供体细胞核，即将离极体较近的原核作为雌原核去掉。通过这种方法囊胚发育率得到提高^[228]。有关小鼠 RNT 的研究表明，通过注射方法进行细胞核移植后 30min 到 1h 内去除卵母细胞核可以获得活的克隆动物，并且效率与常规核移植克隆相似，而细胞注射后 3h 去核得到的胚胎进行胚胎移植后没有得到孕鼠^[229]。Yang 等 (2010)^[230]的研究表明，完整的小鼠卵母细胞能够有效的将体细胞进行重编程，并且在不去核的情况下得到多倍体胚胎，最终分离培养得到 4n 的 ES 细胞。

4. 促进核重编程的原因

完整卵母细胞促进核重编程的主要原因是细胞质中的染色体相关因子，如减数分裂时调节染色体变化的细胞因子，它们均存在于中期染色体附近，与供体核的重编程有关^[231]。供体核和卵母细胞染色体共同孵育使得这些因子从卵胞质从容进入供体核，有利于供体核的重编程。在有丝分裂中对染色体结构进行整体调控中发挥作用的胞质因子（如 A-kinase anchoring protein AKAP95）在卵母细胞中期板上也有分布^[231]。此外，在减数分裂成熟和受精过程中调控母源染色体的因子（如 MPF）也在中期染色体周围分布^[232]。母源染色质相关因子的存在有利于牛克隆胚胎的核重编程^[223]。正常克隆胚胎中微卫星区域出现异常的去甲基化，而将细胞注射到完整卵母细胞后得到的胚胎中去甲基化很有效，说明存在卵母细胞

特异的去甲基化活性,该活性修饰 DNA 的表观遗传状态。这些结果说明,卵母细胞核相关的因子对体细胞核移植重编程过程起到重要作用。

综上所述,卵母细胞的发生有着严格的调控机制,进行着一种不对称的细胞分裂,保证了产生的卵母细胞含有足够的、用以支持受精后胚胎发育的营养和遗传物质,积累足够的用以使精子发生生命作用的物质因子。也正是由于卵母细胞中存在足够的遗传与营养物质,才有可能使得体细胞克隆成为可能。因此,深入探讨卵母细胞的发生与成熟过程及其机制,不仅对有性生殖有重要意义,对于动物的无性繁殖与生殖具有更大的意义。

参考文献:

- [1] Clevers H. Stem cells, asymmetric division and cancer. *Nat. Genet.* 2005, 37: 1027-1028.
- [2] Jan YN, Jan LY. Polarity in cell division: what frames the fearful asymmetry? *Cell*, 2000, 100(6): 599-602.
- [3] Nelson WJ. Adaptation of core mechanisms to generate cell Polarity. *Nature*, 2003, 422(6933): 766-774.
- [4] Bilder D, Li M, Perrimon N. Cooperative regulation of cell polarity and growth by *Drosophila* tumor suppressors. *Science*, 2000, 289: 113-116.
- [5] Stein M, Wandinger-Ness A, Roitbak T. Altered trafficking and epithelial cell polarity in disease. *Trends Cell Biol*, 2002, 12: 374-381.
- [6] Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol*, 2003, 15: 740-746.
- [7] Wu X, Wang P, Brown CA, et al. Zygote arrest 1 (Zar1) is an evolutionarily conserved gene expressed in vertebrate ovaries. *Biol Reprod* 2003, 69: 861-867.
- [8] Tong ZB, Gold L, Pfeifer KE, et al. Mater, a maternal effect gene required for early embryonic development in mice. *Nat Genet* 2000, 26: 267-268.
- [9] Zheng P, Dean J. Role of Filia, a maternal effect gene, in maintaining euploidy during cleavage-stage mouse embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009, 106: 7473-7478.
- [10] Brunet S, Maro B. Cytoskeleton and cell cycle control during meiotic maturation of the mouse oocyte: integrating time and space. *Reproduction*, 2005, 130: 801-811.
- [11] Albertini DF, Barrett SL. The developmental origins of mammalian oocyte polarity. *Semin Cell Dev Biol* 2004, 15: 599-606.
- [12] Brunet S, Maro B. Germinal vesicle position and meiotic maturation in mouse oocyte. *Reproduction* 2007, 133: 1069-1072.
- [13] Schuh M, Ellenberg J. Self-organization of MTOCs replaces centrosome function during acentrosomal spindle assembly in live mouse oocytes. *Cell* 2007, 130: 484-498.
- [14] Verlhac MH, Lefebvre C, Guillaud P, et al. Asymmetric division in mouse oocytes: With or without Mos. *Curr. Biol.* 2000, 10, 1303-1306.
- [15] Dumont J, Million K, Sunderland K, et al. Formin-2 is required for spindle migration and for the late steps of cytokinesis in mouse oocytes. *Dev Biol* 2007a, 301: 254-265.
- [16] Brunet S, Dumont J, Lee KW, et al. Meiotic regulation of TPX2 protein levels governs cell cycle progression in mouse oocytes. *PLoS ONE* 2008, 3: e3338.
- [17] Zhu ZY, Chen DY, Li JS, et al. Rotation of meiotic spindle is controlled by microfilaments in mouse oocytes. *Biol Reprod* 2003, 68: 943-946.
- [18] Goud A, Goud P, Qian C, et al. Cryopreservation of human germinal vesicle stage and in vitro matured M II oocytes: influence of cryopreservation media on the survival, fertilization, and early cleavage divisions. *Fertil Steril* 2000, 74: 487-494.
- [19] Nogueira D, Albano C, Adriaenssens T, et al. Human oocytes reversibly arrested in prophase I by phosphodiesterase type 3 inhibitor in vitro. *Biol Reprod* 2003, 69: 1042-1052.

- [20] Sathananthan AH, Selvaraj K, Girijashankar ML, et al. From oogonia to mature oocytes: inactivation of the maternal centrosome in humans. *Microsc Res Tech* 2006, 69: 396-407.
- [21] Kim NH, Day BN, Lee HT, et al. Microfilament assembly and cortical granule distribution during maturation, parthenogenetic activation and fertilisation in the porcine oocyte. *Zygote* 1996a, 4: 145-149.
- [22] Kim NH, Funahashi H, Prather RS, et al. Microtubule and microfilament dynamics in porcine oocytes during meiotic maturation. *Mol Reprod Dev* 1996b, 43: 248-255.
- [23] Kim NH, Moon SJ, Prather RS, et al. Cytoskeletal alteration in aged porcine oocytes and parthenogenesis. *Mol Reprod Dev* 1996c, 43: 513-518.
- [24] Kim NH, Chung HM, Cha KY, et al. Microtubule and microfilament organization in maturing human oocytes. *Hum Reprod* 1998, 13: 2217-2222.
- [25] Lee J, Miyano T, Moor RM. Spindle formation and dynamics of gamma-tubulin and nuclear mitotic apparatus protein distribution during meiosis in pig and mouse oocytes. *Biol Reprod* 2000, 62: 1184-1192.
- [26] Tremoleda JL, Schoevers EJ, Stout TA, Colenbrander B, Bevers MM. Organisation of the cytoskeleton during in vitro maturation of horse oocytes. *Mol Reprod Dev* 2001, 60: 260-269.
- [27] Combelles CM, Albertini DF, Racowsky C. Distinct microtubule and chromatin characteristics of human oocytes after failed in-vivo and in-vitro meiotic maturation. *Hum Reprod* 2003, 18: 2124-2130.
- [28] Li GP, Liu Y, Bunch TD, et al. Asymmetric division of spindle microtubules and microfilaments during bovine meiosis from metaphase I to metaphase III. *Mol Reprod Dev* 2005, 71: 220-226.
- [29] Motosugi N, Dietrich JE, Polanski Z, et al. Space asymmetry directs preferential sperm entry in the absence of polarity in the mouse oocyte. *PLoS Biol* 2006, 4: e135.
- [30] Fisk NM, Ware M, Stanier P, et al. Molecular genetic etiology of twin reversed arterial perfusion sequence. *Am J Obstet Gynecol* 1996, 174: 891-894.
- [31] Riechmann V, Ephrussi A. Axis formation during *Drosophila* oogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 2001, 11: 374-383.
- [32] Johnson MH. From mouse egg to mouse embryo: polarities, axes, and tissues. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2009, 25: 483-512.
- [33] Runge KE, Evans JE, He ZY, et al. Oocyte CD9 is enriched on the microvillar membrane and required for normal microvillar shape and distribution. *Dev Biol* 2007, 304: 317-325.
- [34] Hiiragi T, Solter D. First cleavage plane of the mouse egg is not predetermined but defined by the topology of the two apposing pronuclei. *Nature* 2004, 430: 360-364.
- [35] Stephanie M. Larson, Hyo J. Lee, Pei-hsuan Hung, et al. Evans. Cortical Mechanics and Meiosis II Completion in Mammalian Oocytes Are Mediated by Myosin-II and Ezrin-Radixin-Moesin (ERM) Proteins. *Molecular Biology of the Cell*, 2010, 21: 3182-3192.
- [36] Longo FJ, Chen DY. Development of surface polarity in mouse eggs. *Scan Electron Microsc* 1984, 703-716.
- [37] Ducibella T, Anderson E, Albertini DF, et al. Quantitative studies of changes in cortical granule number and distribution in the mouse oocyte during meiotic maturation. *Dev Biol* 1988, 130: 184-197.
- [38] Carneiro GF, Liu IK, Hyde D, et al. Quantification and distribution of equine oocyte cortical granules

- during meiotic maturation and after activation. *Mol Reprod Dev* 2002, 63: 451-458.
- [39] Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, et al. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology* 2009, 71: 836-848.
- [40] Glotzer M. The 3Ms of central spindle assembly: microtubules, motors and MAPs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009, 10: 9-20.
- [41] Stéphane Brunet and Marie H el ene Verlhac. Positioning to get out of meiosis: the asymmetry of division. *Human Reproduction Update* 2011, 17(1):68-75
- [42] Webb M, Howlett SK, Maro B. Parthenogenesis and cytoskeletal organization in ageing mouse eggs. *J Embryol Exp Morphol* 1986, 95: 131-145.
- [43] Sathananthan AH. Ultrastructure of the human egg. *Hum Cell* 1997, 10: 21-38
- [44] Diaz H, Esponda P. Ageing-induced changes in the cortical granules of mouse eggs. *Zygote* 2004, 12: 95-103.
- [45] Pan H, Ma P, Zhu W, et al. Age-associated increase in aneuploidy and changes in gene expression in mouse eggs. *Dev Biol* 2008, 316: 397-407.
- [46] Yang HY, Mains PE, McNally FJ. Kinesin-1 mediates translocation of the meiotic spindle to the oocyte cortex through KCA-1, a novel cargo adapter. *J. Cell Biol.* 169, 447-457 (2005).
- [47] Lei Y, Warrior R. The *Drosophila* Lissencephaly1 (DLis1) gene is required for nuclear migration. *Dev. Biol.* 226, 57-72 (2000).
- [48] Miyazaki A, Kato KH, Nemoto S. Role of microtubules and centrosomes in the eccentric relocation of the germinal vesicle upon meiosis reinitiation in sea-cucumber oocytes. *Dev. Biol.* 280, 237-247 (2005).
- [49] Longo FJ, Chen DY. Development of cortical polarity in mouse eggs: involvement of the meiotic apparatus. *Dev Biol* 1985, 107: 382-394.
- [50] Maro B, Johnson MH, Webb M and Flach G. Mechanism of polar body formation in the mouse oocyte: an interaction between the chromosomes, the cytoskeleton and the plasma membrane. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1986, 92: 11-32
- [51] Leader B, Lim H, Carabatsos MJ, et al. Formin-2, polyploidy, hypofertility and positioning of the meiotic spindle in mouse oocytes. *Nat. Cell Biol.* 2002, 4: 921-928.
- [52] Dumont J, Petri S, Pellegrin F, et al. A centriole- and RanGTP-independent spindle assembly pathway in meiosis I of vertebrate oocytes. *J Cell Biol* 2007b, 176: 295-305.
- [53] Azoury J, Lee KW, Georget V, et al. Spindle positioning in mouse oocytes relies on a dynamic meshwork of actin filaments. *Curr Biol* 2008, 18: 1514-1519.
- [54] Schuh M, Ellenberg J. A new model for asymmetric spindle positioning in mouse oocytes. *Curr Biol* 2008, 18: 1986-1992.
- [55] Brunet S, Polanski Z, Verlhac MH, et al. Bipolar meiotic spindle formation without chromatin. *Curr Biol* 1998, 8: 1231-1234.
- [56] Ai JS, Wang Q, Li M, et al. Roles of microtubules and microfilaments in spindle movements during rat oocyte meiosis. *J Reprod Dev.* 2008, 54(5): 391-396
- [57] Navarro PA, Liu L, Trimarchi JR, et al. Noninvasive imaging of spindle dynamics during mammalian

- oocyte activation. *Fertil Steril*. 2005, 83. Suppl 1: 1197-1205.
- [58] Wang L, Wang ZB, Zhang X, et al. Brefeldin A disrupts asymmetric spindle positioning in mouse oocytes. *Dev Biol* 2008, 313: 155-166.
- [59] Li H, Guo F, Rubinstein B, Li R. Actin-driven chromosomal motility leads to symmetry breaking in mammalian meiotic oocytes. *Nat Cell Biol* 2008, 10: 1301-1308.
- [60] Weber KL, Sokac AM, Berg JS, et al. A microtubule-binding myosin required for nuclear anchoring and spindle assembly. *Nature* 2004, 431: 325-329.
- [61] Evsikov AV, Graber JH, Brockman JM, et al. Cracking the egg: molecular dynamics and evolutionary aspects of the transition from the fully grown oocyte to embryo. *Genes Dev* 2006, 20: 2713-2727.
- [62] Simerly C, Nowak G, de Lanerolle P, et al. Differential expression and functions of cortical myosin IIA and IIB isoforms during meiotic maturation, fertilization, and mitosis in mouse oocytes and embryos. *Mol Biol Cell* 1998, 9: 2509-2525.
- [63] Morrison DL, Sanghera JS, Stewart J, et al. Phosphorylation and activation of smooth muscle myosin light chain kinase by MAP kinase and cyclin-dependent kinase-1. *Biochem Cell Biol* 1996, 74: 549-557.
- [64] Phillips KP, Petrunewich MA, Collins JL, et al. Inhibition of MEK or cdc2 kinase parthenogenetically activates mouse eggs and yields the same phenotypes as *Mos*(*-/-*) parthenogenotes. *Dev Biol* 2002, 247: 210-223.
- [65] Connors SA, Kanatsu-Shinohara M, Schultz RM, et al. Involvement of the cytoskeleton in the movement of cortical granules during oocyte maturation, and cortical granule anchoring in mouse eggs. *Dev. Biol.* 1998, 200: 103-115
- [66] Deng M, Kishikawa H, Yanagimachi R, et al. Chromatin-mediated cortical granule redistribution is responsible for the formation of the cortical granule-free domain in mouse eggs. *Dev. Biol.* 2003, 257: 166-176
- [67] Maro B, Johnson MH, Pickering SJ, et al. Changes in the actin distribution during fertilisation of the mouse egg. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1984, 81: 211-237
- [68] Maro B, Verlhac MH. Polar body formation: new rules for asymmetric divisions. *Nat Cell Biol* 2002, 4: E281-E283.
- [69] Deng M, Williams CJ and, Schultz RM. Role of MAP kinase and myosin light chain kinase in chromosome-induced development of mouse egg polarity. *Dev. Biol.* 2005, 278: 358-366
- [70] Deng M, Suraneni P, Schultz RM, Li R. The Ran GTPase mediates chromatin signaling to control cortical polarity during polar body extrusion in mouse oocytes. *Dev Cell* 2007, 12: 301-308.
- [71] Caudron M, Bunt G, Bastiaens P, et al. Spatial coordination of spindle assembly by chromosome-mediated signaling gradients. *Science* 2005, 309: 1373-1376.
- [72] Halet G, Carroll J. Rac activity is polarized and regulates meiotic spindle stability and anchoring in mammalian oocytes. *Dev Cell* 2007, 12: 309-317.
- [73] Bement WM, Miller AL, von Dassow G. Rho GTPase activity zones and transient contractile arrays. *Bioessays* 2006, 28: 983-993.
- [74] Winston NJ, McGuinness O, Johnson MH, et al. The exit of mouse oocytes from meiotic M-phase requires an intact spindle during intracellular calcium release. *J. Cell Sci.* 1995, 108: 143-151

- [75] Henrique D, Schweisguth F. Cell polarity: the ups and downs of the Par6/aPKC complex. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2003, 13: 341-350.
- [76] Knoblich JA. Asymmetric cell division during animal development. *Nat. Rev., Mol. Cell Biol.* 2001, 2: 11-20.
- [77] Macara IG. Parsing the polarity code. *Nat. Rev., Mol. Cell Biol.* 2004, 5: 220-231.
- [78] Ohno S. Intercellular junctions and cellular polarity: the PAR-aPKC complex, a conserved core cassette playing fundamental roles in cell polarity. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2001, 13: 641-648.
- [79] Pellettieri J, Seydoux G. Anterior-posterior polarity in *C. elegans* and *Drosophila*-PARallels and differences. *Science* 2002, 298: 1946-950.
- [80] Nakaya M, Fukui A, Izumi Y, et al. Meiotic maturation induces animal-vegetal asymmetric distribution of aPKC and ASIP/PAR-3 in *Xenopus* oocytes. *Development* 2000, 127: 5021-5031.
- [81] Page Baluch D, Koeneman BA, Hatch KR, et al. PKC isotypes in post-activated and fertilized mouse eggs: association with the meiotic spindle. *Dev Biol* 2004, 274: 45-55.
- [82] Vinot S, Le T, Maro B, et al. Two PAR6 proteins become asymmetrically localized during establishment of polarity in mouse oocytes. *Curr. Biol.* 2004, 14: 520-525.
- [83] Duncan FE, Moss SB, Schultz RM, et al. PAR-3 defines a central subdomain of the cortical actin cap in mouse eggs. *Dev Biol*, 2005, 280: 38-47.
- [84] Doe CQ. Neural stem cells: balancing self-renewal with differentiation. *Development*, 2008, 135: 1575-1587.
- [85] Knoblich JA. Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell*, 2008, 132: 583-597.
- [86] Zhong W, Chia W. Neurogenesis and asymmetric cell division. *Curr Opin Neurobiol*, 2008, 18: 4-11.
- [87] Wang JC, Lv H, Gao X., Yan JH., Chen ZJ. Dlg1 is highly polarized during mouse oocytes meiotic maturation. *Fertility and Sterility*. 2008, 90(Sup. 1): 473.
- [88] Jun-Chao Wang, Hong Lv, Xuan Gao, et al. Expression and distribution of Dlg1 during meiotic maturation in mouse oocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications Biochem Biophys Res Commun.* 2009, Oct 9
- [89] Logan MR, Mandato CA. Regulation of the actin cytoskeleton by PIP2 in cytokinesis. *Biol Cell.* 2006, 98(6): 377-388.
- [90] Yoshida S, Bartolini S, Pellman D. Mechanisms for concentrating Rho1 during cytokinesis. *Genes Dev.* 2009, 23(7): 810-823.
- [91] Machesky LM, Gould KL. The Arp2/3 complex: a multi-functional actin organizer. *Curr Opin Cell Biol*, 1999, 11(1): 117-121.
- [92] Faix J, Rottner K. The making of filopodia. *Curr Opin Cell Biol*, 2006, 18(1): 18-25
- [93] Quinlan ME, Heuser JE, Kerkhoff E, et al. *Drosophila* Spire is an actin nucleation factor. *Nature*, 2005, 433(7024): 382-388
- [94] Mullins RD, Heuser JA, Pollard TD. The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998, 95: 6181-6186
- [95] Machesky LM, Insall RH. Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the

- actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr Biol*, 1998, 8(25): 1347-1356
- [96] Higgs HN, Pollard TD. Activation by Cdc42 and PIP(2) of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) stimulates actin nucleation by Arp2/3 complex. *J Cell Biol*, 2000, 150(6): 1311-1320
- [97] Faix J and Grosse, R. Staying in shape with formins. *Dev. Cell*, 2006, 10: 693-706
- [98] Kovar DR. Molecular details of formin-mediated actin assembly. *Curr Opin Cell Biol*, 2006, 18(1): 11-17.
- [99] Li F, Higgs HN. Dissecting requirements for auto-inhibition of actin nucleation by the formin, mDia1. *J Biol Chem*, 2005, 280(8): 6986-6992
- [100] Kovar DR, Pollard TD. Progressing actin: forming as a processive elongation machine. *Nat. Cell Biol.* 2004, 6: 1158-1159
- [101] Schirenbeck A, Bretschneider T, Arasada R, et al. The Diaphanous-related formin dDia2 is required for the formation and maintenance of filopodia. *Nat. Cell Biol.* 2005, 7: 619-625.
- [102] Evangelista M, Zigmond S, Boone C. Formins: signaling effectors for assembly and polarization of actin filaments. *J. Cell Sci.* 2003, 116: 2603-2611.
- [103] Leader B, Leder P. Formin-2, a novel formin homology protein of the cappucino subfamily, is highly expressed in the developing and adult central nervous system. *Mech. Dev.* 2000, 93: 221-231.
- [104] Niwa R, Nagata-Ohashi K, Takeichi M, et al. Control of actin reorganization by Slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin. *Cell*, 2002, 108(2): 233-246.
- [105] Wen Z, Han L, Bamburg JR, et al. BMP gradients steer nerve growth cones by a balancing act of LIM kinase and Slingshot phosphatase on ADF/cofilin. *J Cell Biol*, 2007, 178(1): 107-119.
- [106] Pantaloni D, Le Clainche C, Carlier MF. Mechanism of actin-based motility. *Science*, 2001, 292(5521): 1502-1506.
- [107] Pollard TD, Borisy GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, 2003, 112(4): 453-465.
- [108] Vale RD. The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell*, 2003, 112: 467-480.
- [109] Munro E, Nance J, Priess JR. Cortical flows powered by asymmetrical contraction transport PAR proteins to establish and maintain anterior-posterior polarity in the early *C. elegans* embryo. *Dev. Cell*, 2004: 413-424.
- [110] Rosenblatt J, Cramer LP, Baum B et al. Myosin II-dependent cortical movement is required for centrosome separation and positioning during mitotic spindle assembly. *Cell*, 2004, 117: 361-372 .
- [111] Lenart P, et al. A contractile nuclear actin network drives chromosome congression in oocytes. *Nature* 2005, 436: 812-818.
- [112] Kubiak J, Paldi A, Weber M, Maro B. Genetically identical parthenogenetic mouse embryos produced by inhibition of the first meiotic cleavage with cytochalasin D. *Development*. 1991, 111(3): 763-769.
- [113] Terada Y, Simerly C, Schatten G. Microfilament stabilization by jasplakinolide arrests oocyte maturation, cortical granule exocytosis, sperm incorporation cone resorption, and cell-cycle progression, but not DNA replication, during fertilization in mice. *Mol Reprod Dev.* 2000, 56(1): 89-98.
- [114] Woolner S, O'Brien LL, Wiese C, et al. Myosin-10 and actin filaments are essential for mitotic spindle function. *J. Cell Biol.* 2008, 182: 77-88.

- [115] Goode BL, Drubin DG, Barnes G. Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2000, 12: 63-71.
- [116] Rodriguez OC, Schaefer AW, Mandato CA, et al. Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nat. Cell Biol.* 2003, 5: 599-609.
- [117] Goode BL, Eck MJ. Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annu. Rev. Biochem.* 2007, 76: 593-627.
- [118] Waterman-Storer C, Duey DY, Weber KL, et al. Microtubules remodel actomyosin networks in *Xenopus* egg extracts via two mechanisms of F-actin transport. *J. Cell Biol.* 2000, 150: 361-376
- [119] Maro B, Johnson MH, Pickering SJ, et al. Changes in actin distribution during fertilization of the mouse egg. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1984, 81: 211-237.
- [120] Kim SK. Cell polarity: new PARTners for Cdc42 and Rac. *Nat Cell Biol.* 2000, 2: E143-E145.
- [121] Etienne-Manneville S, Hall A. Cdc42 regulates GSK-3beta and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. *Nature.* 2003, 421(6924): 753-756.
- [122] Na J, Zernicka-Goetz M. Asymmetric positioning and organization of the meiotic spindle of mouse oocytes requires CDC42 function. *Curr Biol.* 2006, 16(12): 1249-1254.
- [123] Imahie H, Takahashi M, Toyoda Y, et al. Differential effects of cytochalasin B on cytokinesis in parthenogenetically activated mouse oocytes, *J Reprod Dev*, 2002, 48: 31-40.
- [124] Matson S, Markoulaki S, Ducibella T. Antagonists of myosin light chain kinase and of myosin II inhibit specific events of egg activation in fertilized mouse eggs, *Biol Reprod*, 2006, 74: 169-176.
- [125] Terada Y, Simerly C, Schatten G. Microfilament stabilization by jasplakinolide arrests oocyte maturation, cortical granule exocytosis, sperm incorporation cone resorption, and cell-cycle progression, but not DNA replication, during fertilization in mice, *Mol Reprod Dev*, 2000, 56: 89-98.
- [126] Etienne Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature*, 2002, 420: 629-635.
- [127] Sah VP, Seasholtz TM, Sagi SA, et al. The role of Rho in G protein couple receptor signal transduction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2000, 40: 459-489 .
- [128] Kuhn T B, Meberg P J, Brown M D, et al. Regulating actin dynamics in neuronal growth cones by ADF/cofilin and rho family GTPases. *J Neurobiol*, 2000, 44 (2): 126-144.
- [129] Piekny A, Werner M, Glotze M. Cytokinesis: welcome to the Rho zone. *Trends Cell Biol*, 2005, 15 (12): 651-658.
- [130] Paduch M, Jelen F, Otlewski J. Structure of small G proteins and their regulators. *Acta Biochim Pol*, 2001, 48: 829-850.
- [131] Ron D, Zannini M, Lewis M, et al. A region of proto2dbl essential for its transforming activity shows sequence similarity to a yeast cell cycle gene, CDC24, and the human breakpoint cluster gene, bcr. *New Biol*, 1991, 3 (4): 372-379
- [132] Haeusler LC, Blumenstein L, Stege P, et al. Comparative functional analysis of the Rac GTPases. *FEBS Lett*, 2003, 555 (3): 556-560.
- [133] Bishop AL, Hall A. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J*, 2000, 348: 241-255.
- [134] Fidyk NJ, Cerione RA. Understanding the catalytic mechanism of GTPase-activating proteins: demonstration of the importance of switch domain stabilization in the stimulation of GTP hydrolysis.

Biochemistry, 2002, 41 (52): 15644-15653.

- [135] DerMardirossian C, Bokoch G M. GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends Cell Biol*, 2005, 15 (7): 356-363.
- [136] Hoffman GR, Nassar N, Cerione RA. Structure of the Rho family GTP-binding protein Cdc42 in complex with the multifunctional regulator Rho GDI. *Cell*, 2000, 100 (3): 345-356.
- [137] Vinot S, Le T, Maro B, et al. Two Par6 proteins become asymmetrically localized during establishment of polarity in mouse oocytes. *Curr Biol*, 2004, 14: 520-525.
- [138] Duncan FE, Moss SB, Schultz RM, et al. PAR-3 defines a central subdomain of the cortical actin cap in mouse eggs. *Dev Biol*, 2005, 280: 38-47.
- [139] Doe CQ. Cell polarity: the PARty expands. *Nat Cell Biol*, 2001, 3: E1-E3.
- [140] Kim SK. Cell polarity: new PARTners for Cdc42 and Rac. *Nat Cell Biol*, 2000, 2: E143-E145.
- [141] Hughes M, Zhang C, Avis JM, et al. The role of the ran GTPase in nuclear assembly and DNA replication: characterisation of the effects of Ran mutants. *J Cell Sci*. 1998, 111 (Pt 20): 3017-3026.
- [142] Wilde A, Zheng Y. Stimulation of microtubule aster formation and spindle assembly by the small GTPase Ran. *Science*. 1999 May 21, 284(5418): 1359-1362.
- [143] Gruss OJ, Vernos I. The mechanism of spindle assembly: functions of Ran and its target TPX2. *J. Cell Biol*. 2004, 166: 949-955.
- [144] Zheng Y. G protein control of microtubule assembly. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 2004, 20, 867-894.
- [145] Kalab P, Weis K, Heald R. Visualization of a Ran-GTP gradient in interphase and mitotic *Xenopus* egg extracts. *Science* 200, 2295: 2452-2456.
- [146] Kalab P, Pralle A, Isacoff EY, et al. Analysis of a RanGTP-regulated gradient in mitotic somatic cells. *Nature* 2006, 440: 697-701.
- [147] Ma C, Benink HA, Cheng D, et al. Cdc42 activation couples spindle positioning to first polar body formation in oocyte maturation. *Curr. Biol*. 2006, 16: 214-220.
- [148] Gard DL, Affleck D, Error BM. Microtubule organization, acetylation and nucleation in *Xenopus laevis* oocytes: II. A developmental transition in microtubule organization during early diplotene. *Dev. Biol*. 1995, 168: 189-201.
- [149] Huchon D, Crozet N, Cantenot N, et al. Germinal vesicle breakdown in the *Xenopus laevis* oocyte: description of a transient microtubular structure. *Reprod. Nutr. Dev*. 1981, 21: 135-148.
- [150] Szöllösi D, Calarco P, Donahue RP. Absence of centrioles in the first and second meiotic spindles of mouse oocytes. *J. Cell Sci*. 1972, 11: 521-541.
- [151] Gruss OJ, Carazo-Salas RE, Schatz CA, et al. Ran induces spindle assembly by reversing the inhibitory effect of importin alpha on TPX2 activity. *Cell*. 2001, 104(1): 83-93.
- [152] Deng M, Suraneni P, Schultz RM, Li R. The RanGTPase mediates chromatin signaling to control cortical polarity during polar body extrusion in mouse oocytes. *Dev. Cell* 2007, 12: 301-308.
- [153] Na J, and Zernicka-Goetz M. Asymmetric positioning and organization of the meiotic spindle of mouse oocytes requires CDC42 function. *Curr Biol*, 2006, 16: 1249-1254.
- [154] Natale DR and Watson AJ. Rac-1 and IQGAP are potential regulators of E-cadherin- catenin interactions during murine preimplantation development. *Mech Dev*, 2002, 119(Suppl 1): S21-26.

- [155] Kumakiri J, Oda S, Kinoshita K, et al. Involvement of Rho family G protein in the cell signaling for sperm incorporation during fertilization of mouse eggs: inhibition by *Clostridium difficile* toxin B. *Dev Biol*, 2003, 260: 522-535.
- [156] Lin SL, Qi ST, Sun SC, et al. PAK1 regulates spindle microtubule organization during oocyte meiotic maturation. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2010, 2: 1254-64.
- [157] Bielak-Zmijewska A, Kolano A, Szczepanska K, et al. Cdc42 protein acts upstream of IQGAP1 and regulates cytokinesis in mouse oocytes and embryos. 2008, 322(1): 21-32.
- [158] Zhong ZS, Huo LJ, Liang CG, et al. Small GTPase RhoA is required for ooplasmic segregation and spindle rotation, but not for spindle organization and chromosome separation during mouse oocyte maturation, fertilization, and early cleavage. *Molecular Reproduction and Development*, 2005, 71: 256-261
- [159] Glotzer M. The molecular requirements for cytokinesis. *Science*, 2005, 307: 1735-1739.
- [160] Li GP, Cai SX, Xu LB, et al. Studies on the early development of mouse tetraploid embryos produced by electrofusion. *Developmental & Reproductive Biology*, 2000, 7(1): 17-23.
- [161] Eakin GS, Behringer RR. Tetraploid development in the mouse. *Dev Dyn* 2003, 228: 751-766.
- [162] Goto T, Monk M. Regulation of X-chromosome inactivation in development in mice and humans. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, 62: 362-378.
- [163] Snow MH. Tetraploid mouse embryos produced by cytochalasin B during cleavage. *Nature*, 1973, 244(5417): 513-515.
- [164] Kaufman MH, Webb S. Postimplantation development of tetraploid mouse embryos produced by electrofusion. *Development* 1990, 110: 1121-1132.
- [165] Gallardo MH, Bickham JW, Honeycutt RL, et al. Discovery of tetraploidy in a mammal. *Nature*, 1999, 401(6751): 341.
- [166] McFeely R. Aneuploidy, polyploidy, and structural rearrangement of chromosomes in mammals other than man. In: Benirschke K, editor. *Comparative mammalian cytogenetics*. Hanover, NH: Springer-Verlag. 1969, 434-444.
- [167] Edwards RG. Colchicine-induced heteroploidy in early mouse embryos. *Nature*, 1954, 174: 276-277.
- [168] Carr D. Chromosomal anomalies in human fetuses. *Res Reprod*, 1972, 4: 3-4.
- [169] Creasy MR, Crolla JA, Alberman ED. A cytogenetic study of human spontaneous abortions using banding techniques. *Hum Genet*, 1976, 31: 177-196.
- [170] Hassold T, Chen N, Funkhouser J, et al. A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. *Ann Hum Genet* 1980, 44: 151-178.
- [171] Kajii T, Ferrier A, Niikawa N, Takahara H, Ohama K, Avirachan S. Anatomic and chromosomal anomalies in 639 spontaneous abortuses. *Hum Genet* 1980, 55: 87-98.
- [172] Tang PC, Ritchie WA, Wilmot I, West JD. The effects of cell size and ploidy on cell allocation in mouse chimaeric blastocysts. *Zygote*, 2000, 8(1): 33-43.
- [173] Modlinski JA. 1981. The fate of inner cell mass and trophoblast nuclei transplanted to fertilized mouse eggs. *Nature*, 292: 342-343.
- [174] Kubiak JZ, Tarkowski AK. Electrofusion of mouse blastomeres. *Exp Cell Res*, 1985, 157: 561-566.

- [175] Graham CF. 1971. Virus assisted fusion of embryonic cells. *Acta Endocrinol*, 153(suppl.): 154-167.
- [176] O'Neil GT, Speirs S, Kaufman MH. Sex-chromosome constitution of postimplantation tetraploid mouse embryos. *Cytogenet Cell Genet*, 1990, 53: 191-195.
- [177] Eglitis MA. Formation of tetraploid mouse blastocysts following blastomere fusion with polyethylene glycol. *J Exp Zool*, 1980, 213: 309-313.
- [178] Senda M, Takeda J, Abe S, et al. Induction of cell fusion of plant protoplasts by electric stimulation. *Plant Cell Physiol*, 1979, 20: 1441-1443.
- [179] Wakayama T. Cloning of male mice from adult tail-tip cells. *Natl Genet*, 1999, 22: 127-128
- [180] Baguisi A, et al. Induced enucleation in nuclear transfer procedures to produce cloned animals. *Theriogenology*, 2000, 53: 209
- [181] Snow MH. Embryonic development of tetraploid mice during the second half of gestation. *J Embryol Exp Morphol*, 1975, 34: 707-721.
- [182] Tarkowski AK, Witkowska A, Opas J. Development of cytochalasin B-induced tetraploid and diploid/tetraploid mosaic mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol*, 1977, 41: 47-64.
- [183] Ozil JP, Modlinski JA. Effects of electric field on fusion rate and survival of 2-cell rabbit embryos. *J Embryol Exp Morphol*, 1986, 96: 211-228.
- [184] Henery CC, Kanfman. Relationship between cell size and nuclear volume in nucleated red blood cells of developmentally matched diploid and tetraploid mouse embryos. *J Exp Zool*, 1992, 261(4): 472-478.
- [185] Koizumi N, Fukuta K. Preimplantation development of tetraploid mouse embryo produced by cytochalasin B. *Exp Anim*, 1995, 44(2): 105-109.
- [186] Schultz R M. Regulation of zygotic gene activation in the mouse. *Biodssay*, 1993, 15: 531-538
- [187] Eglitis MA, Wiley LM. Tetraploidy and early development: effects on developmental timing and embryonic metabolism. *Embryol Exp Morphol* 1981, 66: 91-108.
- [188] Petzoldt U. Developmental profile of glucose phosphate isomerase allozymes in parthenogenetic and tetraploid mouse embryos. *Development*, 1991, 112: 471-476.
- [189] King WA. Chromosome abnormalities and pregnancy failure in domestic animals. In: McFeely R, ed.. *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*. San Diego CA, Academic Press, 1990, 34: 229-250.
- [190] Jacobs PA. The role of chromosomal abnormalities in reproductive failure. *Reprod Nutr Dev*, 1990, (Suppl 1): 63-74.
- [191] Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*, 2001(5532), 293: 1089-1093.
- [192] Tycko B, Morison IM. Physiological function of imprinted genes. *Journal of Cellular Physiology*, 2002, 192: 245-258.
- [193] Kono T, Obata Y, Wu Q, et al. Birth of parthenogenetic mice that can develop to adulthood. *Nature*, 2004, 428: 860-864.
- [194] Eakin GS, Behringer RR. Tetraploid development in the mouse. *Dev Dyn* 2003, 228: 751-766.
- [195] Ueda O, Jishage K, Kamada N, et al. Production of mice entirely derived from embryonic stem (ES) cell with many passages by coculture of ES cells with cytochalasin B induced tetraploid embryos. *Exp. Anim.*

1995, 44, 205-210.

- [196] Wang ZQ, Kiefer F, Urba'nek P, et al. Generation of completely embryonic stem cell-derived mutant mice using tetraploid blastocyst injection. *Mech. Dev.* 1997, 62: 137-145.
- [197] Zhao XY, L W, Lv Z, et al. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature* 2009, 461: 86-90.
- [198] Kang L, Wang J, Zhang Y, et al. iPS cells can support full-term development of tetraploid blastocyst-complemented embryos. *Cell Stem Cell.* 2009, 5: 135-138.
- [199] Guillemot F, Nagy A, Auerbach A, et al. Essential role of Mash-2 in extraembryonic development. *Nature*, 1994, 371(6495): 333-336.
- [200] Jiangwei Lin, Linyu Shi, Man Zhang, et al. Defects in Trophoblast Cell Lineage Account for the Impaired In Vivo Development of Cloned Embryos Generated by Somatic Nuclear Transfer. *Cell Stem Cell*, 2011, 8: 371-375
- [201] Antczak M, Van Blerkom J. Oocyte influences on early development: the regulatory proteins leptin and STAT3 are polarized in mouse and human oocytes and differentially distributed within the cells of the preimplantation stage embryo. *Mol Hum Reprod.* 1997, 3(12): 1067-1086.
- [202] Calarco PG. Polarization of mitochondria in the unfertilized mouse oocyte. *Dev Genet.* 1995, 16(1): 36-43.
- [203] Nicosia SV, Wolf DP, Inoue M. Cortical granule distribution and cell surface characteristics in mouse eggs. *Dev Biol.* 1977, 57(1): 56-74.
- [204] Nagy ZP, Liu J, Joris H, Bocken G, Desmet B, Van Ranst H, Vankelecom A, Devroey P, Van Steirteghem AC. The influence of the site of sperm deposition and mode of oolemma breakage at intracytoplasmic sperm injection on fertilization and embryo development rates. *Hum Reprod.* 1995, 10(12): 3171-3177.
- [205] Kono T, Kwon OY, Nakahara T. Development of enucleated mouse oocytes reconstituted with embryonic nuclei. *J Reprod Fertil.* 1991, 93(1): 165-172.
- [206] Hardarson T, Lundin K, Hamberger L. The position of the metaphase II spindle cannot be predicted by the location of the first polar body in the human oocyte. *Hum Reprod.* 2000, 15(6): 1372-1376.
- [207] Blake M, Garrisi J, Tomkin G, Cohen J. Sperm deposition site during ICSI affects fertilization and development. *Fertil Steril.* 2000, 73(1): 31-37.
- [208] G Anifandis, K Dafopoulos, CI Messini, N Chalvatzas and IE Messinis. Effect of the Position of the Polar Body During ICSI on Fertilization Rate and Embryo Development. *Reproductive Sciences* 2010, 17(9): 849-853.
- [209] Wakayama, T., Perry, A.C., Zuccotti, M., et al. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 1998, 394: 369-374.
- [210] Hill, J.R. Abnormal in utero development of cloned animals: implications for human cloning. *Differentiation* 2002, 69: 174-178.
- [211] Campbell KHS, Alberio R. Reprogramming the genome: role of the cell cycle. *Reproduction* 2003, Suppl. 61: 477-494.
- [212] Armstrong L, Lako M, Dean W, et al. Epigenetic modification is central to genome reprogramming in

- somatic cell nuclear transfer. *Stem Cells*, 2006, 24(4): 805-814.
- [213] Beaujean N, Taylor J, Gardner J, et al. Effect of limited DNA methylation reprogramming in the normal sheep embryo on somatic cell nuclear transfer. *Biology of Reproduction*, 2004, 71(1): 185-193.
- [214] Campbell KH, Fisher P, Chen W C, et al. Somatic cell nuclear transfer: Past, present and future perspectives. *Theriogenology*, 2007, 68(Suppl 1): S214-231.
- [215] Dean W, Santos F, Reik W. Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 2003, 14(1): 93-100.
- [216] Dinnyes A, De Sousa P, King T, et al. Somatic cell nuclear transfer: recent progress and challenges. *Cloning Stem Cells*, 2002, 4(1): 81-90.
- [217] Gurdon J B. From nuclear transfer to nuclear reprogramming: The reversal of cell differentiation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2006, 22: 1-22.
- [218] Sparman M, Dighe V, Sritanaudomchai H, et al. Epigenetic reprogramming by somatic cell nuclear transfer in primates. *Stem Cells*, 2009, 27(6): 1255-1264.
- [219] Kikyo N, Wade P, Guschin D, et al. Active remodeling of somatic nuclei in egg cytoplasm by the nucleosomal ATPase ISWI. *Science* 2000, 289: 2360-2362.
- [220] Prather R, Kuchholzer B, Lai L, et al. Changes in the structure of nuclei after transfer to oocytes. *Cloning*, 2000, 2: 117-122.
- [221] Miyoshi, K., Rzuclidlo, S.J., Pratt, S.L., et al. Improvements in cloning efficiencies may be possible by increasing uniformity in recipient oocytes and donor cells. *Biol. Reprod.* 2003, 68: 1079-1086.
- [222] Lee JH, Campbell KHS. Effects of enucleation and caffeine on maturation-promoting factor (MPF) and mitogenactivated protein kinase (MAPK) activities in ovine oocytes used as recipient cytoplasts for nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 2006, 74: 691-698.
- [223] Kang Y K, Koo DB, Park JS, et al. Influence of oocyte nuclei on demethylation of donor genome in cloned bovine embryos. *FEBS Lett.* 2001, 499: 55-58.
- [224] Gao S, Gasparrini B, McGarry M, et al. Germinal vesicle material is essential for nucleus remodeling after nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 2002, 67: 928-934.
- [225] Munsie M, O'Brien C, and Mountford P. Transgenic strategy for demonstrating nuclear reprogramming in the mouse. *Cloning Stem Cells* 2002, 4: 121-130.
- [226] Verma P, Du Z, Grupen C, et al. Development of porcine nuclear transfer embryos following post fusion enucleation. *Theriogenology*, 2002, 57: 454(abst).
- [227] Peura TT. Improved In Vitro Development Rates of Sheep Somatic Nuclear Transfer Embryos by Using a Reverse-Order Zona-Free Cloning Method. *Cloning and stem cells*, 2003, 5(1): 13-24
- [228] 陆长富, 林戈谢, 常青, 龚斐, 周虹, 谭跃球, 卢光诱. 人类体细胞克隆胚的构建. *科学通报*, 2003, 48 (17): 1844-1847
- [229] Wakayama, S., Cibelli, J.B., and Wakayama, T. Effect of timing of the removal of oocyte chromosomes before or after injection of somatic nucleus on development of nt embryos. *Cloning Stem Cells* 2003, 5: 181-189.
- [230] Hui Yang, Linyu Shi, Shenghua Zhang, Jiangwei Lin, Jing Jiang, Jinsong Li. High-efficiency somatic reprogramming induced by intact MII oocytes. *Cell Research*, 2010, 20: 1034-1042.

-
- [231] Eide T, Coghlan V, Orstavik S, et al. Molecular cloning, chromosomal localization, and cell cycledependent subcellular distribution of the α -kinase anchoring protein, AKAP95. *Exp. Cell. Res.* 1998, 238: 305-316.
- [232] Casas E, Betancourt M, Bonilla E, et al. Changes in cyclin B localisation during pig oocyte in vitro maturation. *Zygote* 1999, 7: 21-26.

研究论文

第二章 牛、山羊、绵羊卵母细胞成熟过程中细胞核和

细胞骨架的动态学变化

前言

卵母细胞发育成熟是一个极其复杂的过程。哺乳动物在有腔卵泡形成之前,卵泡在 FSH 的作用下开始发育,卵母细胞在这个生长过程中合成并储存大量的蛋白质和 mRNA,为后期的成熟和早期胚胎发育提供信息和能量来源,获得恢复减数分裂能力^[1-3]。恢复减数分裂的标志是发生 GVBD,此后核膜消失,染色体凝集,细胞骨架重新组装成为纺锤体,最后排出第一极体,卵母细胞核成熟。在到达核成熟和胞质成熟之前,卵母细胞中的细胞骨架经历一系列变化,从而促进减数分裂相关分子的转运^[4,5]、染色体的排列以及纺锤体的形成^[6,7]。纺锤体的形成和动态变化主要受微管、微丝和与染色体和微管相关联的动力蛋白等调控^[8-10]。对哺乳动物减数分裂的研究大多数都是以小鼠为动物模型进行的^[11-15]。但是很多大型动物的纺锤体组装和动态变化与小鼠存在差别^[16-19],因此其中的机制也有不同。

体外成熟的卵母细胞在胚胎工程研究中发挥重要作用。体细胞核移植中体细胞必须在去核的卵母细胞内进行重编程,以恢复其全能性,而卵母细胞的成熟程度则会直接影响体细胞的重编程过程,进而影响后期重组胚维持正常的分裂发育^[20,21]。此外,受体卵母细胞核的完全去除是克隆动物生产的前提条件^[22],如果卵母细胞去核不完全可能会造成胚胎的染色体倍性异常,发生孤雌激活或发育受阻、早期胚胎死亡等^[23]。因此,既要保证卵母细胞的充分成熟又要保证去核完全显得尤为重要。由于卵母细胞的去核及注核需要一个一个的进行,极大地限制了核移植胚胎的生产速度。因此,了解卵母细胞体外成熟时间规律和形态特征对于在有限的时间内生产尽量多高质量的核移植胚胎具有重要意义,通过在适当时间去除卵母细胞卵丘后再进一步成熟培养一段时间,既能保证极体与卵母细胞核处于邻近位置以利于去核,又不影响卵母细胞质成熟。本实验对体外成熟过程中牛、山羊、绵羊卵母细胞恢复减数分裂后的核进程事件及细胞骨架的动态变化进行了较为详细的观察对比,为体细胞核移植操作提供参考,以便选择最佳卵母细胞去卵丘时间。

1. 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器设备

体式光学显微镜 (Nikon, SMZ-1500), CO₂培养箱 (立康, HF90), 立式光学显微镜 (Nikon, B12265), 超净工作台 (泰斯特), 激光共聚焦显微镜 (BIO-RAD, MRC-1024ES, OLYMPUS FLUOVIEW FV1000)。

1.1.2 试剂及耗材

体外培养用主要试剂: E2、LH、FSH和无机盐类均为Sigma公司产品, TCM199、FCS、PBS和血清为GIBCO产品。OES (发情羊血清) 为自制。

蛋白检测用主要试剂: 抗小鼠 α -tubulin单克隆抗体(Sigma, T-5168)、FITC偶联的山羊抗鼠IgG(Sigma, F-0257), FITC标记鬼笔环肽(Sigma, P-5282), 透明质酸酶 (日本和光制药株式会社), TrionX-100 (Amresco), 多聚甲醛 (Merck), PI染色液 (sigma, P-4170)。

四孔培养板为 Nunc 产品, 其余玻璃器皿及耗材均为国产。

1.1.3 培养液

羊卵采卵液: M199+2.2g/L NaHCO₃+10mM Hepes+5IU/ml 肝素+1%FBS

羊卵成熟液: M199 成品液+10%OES+0.01 μ g/ml 雌二醇+0.01 IU/ml FSH+1 IU/ml LH+2mM 丙酮酸钠

牛卵成熟液: M199 成品液+10%FBS+0.01 μ g/ml 雌二醇+0.01 IU/ml FSH+1 IU/ml LH

洗卵液: M199+2.2g/L NaHCO₃+25mM Hepes+1%FBS

卵母细胞固定液: PBS(-)+4%多聚甲醛+0.2% TritonX-100

封闭液: PBS(-)+3%BSA

洗液: PBS(-)+0.3%BSA

1.2 方法

1.2.1 卵母细胞的收集和体外成熟培养

山羊、绵羊: 取屠宰母羊卵巢, 置于 25-30℃ 灭菌生理盐水中带回实验室, 用生理盐水洗三遍, 在加有采卵液的培养皿中用手术刀片切割取卵, 光学显微镜下检卵。选择 A 级(有数层致密卵丘细胞)和 B 级 (有数层较疏松卵丘细胞) 未成熟卵母细胞置于成熟培养液, 在

四孔板中培养,按 50 枚/0.5ml 培养卵母细胞。培养条件为 38.5℃、100%湿度和 5%CO₂ 的气相。

牛:取屠宰母牛卵巢,置于 25-30℃灭菌生理盐水中带回实验室,用生理盐水洗三遍,用带 12#针头的 10ml 注射器抽取卵巢表面 2-8mm 卵泡卵,捡卵,选择 A、B 级卵母细胞进行成熟培养,培养浓度和条件同山羊、绵羊卵母细胞。

1.2.2 微管和微丝的免疫荧光染色

成熟培养 0h、2h、4h、6h、8h、10h、16h、20h、24h 和 26h 后的卵母细胞分别在含 0.1% 透明质酸酶的液体中振荡去掉卵丘细胞, PBS(-)+0.3%BSA 洗一遍,在 PBS+4%多聚甲醛 +0.2% TritonX-100 中室温固定通透 1h, PBS+3%BSA 中洗三遍 (3%的 BSA 起到封闭作用), 然后直接进入抗小鼠 α -Tubulin 单克隆抗体中室温 1h 或 4℃ 过夜, 抗体用 PBS(-)+0.3%BSA 按 1:500 稀释。一抗孵育完毕, PBS(-)+0.3%BSA 中洗三遍, 进入 FITC 标记的山羊抗鼠 IgG 室温 1h, 稀释比例为 1:500。PBS(-)+0.3%BSA 洗涤, 用 10 μ g/ml 的 PI 染细胞核。最后, 用甘油:PBS 按 1:1 配制的封片液封片。激光共聚焦系统观察, 拍照。

染微丝时卵母细胞的固定通透同微管的染色。固定后的卵母细胞直接进入按 1:300 稀释的 FITC-鬼笔环肽, 37℃ 1h, PBS(-)+0.3%BSA 洗涤, PI 染核, 封片, 激光共聚焦观察。

2. 结果

2.1 卵母细胞成熟过程中的核成熟进程

分别在成熟培养 0h、2h、4h、6h、8h、12h、16h、20h、24h 和 26h 时收集牛、山羊和绵羊的卵母细胞, 通过对纺锤体微管和染色体的染色分析了在整个体外成熟过程中细胞核的成熟进程 (表 2-1, 图 2-1)。三种动物的卵母细胞在刚开始培养的一段时间内, 90% 以上的卵母细胞都处于 GV 期, 随着进一步培养, 各自显示出一定的特点 (图 2-1 A, B, C)。牛和山羊卵母细胞在成熟培养 4h 后开始发生 GVBD, 12h 即有 50%-60% 的卵母细胞到达 MI 期, 16h 到达 AI/TI 期峰值 (42%), 20h 后牛和山羊分别有 66% 和 84% 的卵母细胞进入 MII 期; 绵羊卵母细胞核成熟进程略慢于牛和山羊, GVBD 发生的时间也是成熟培养 4h 后开始发生, 但达 AI/TI 期峰值的时间和发育为 MII 期的时间分别为 20h (50%) 和 24h (76.5%), 均晚于牛和山羊。

表2-1 牛、山羊、绵羊卵母细胞在体外成熟不同时间的核相

Table 2-1 Nuclear state of oocytes from bovine, goat, sheep at different time during in vitro maturation

成熟时间 Maturation time	GV(%)	PreMI(%)	MI (%)	AI/II(%)	MII(%)	总数 Total
牛卵母细胞						
0h	39(97.5)	1(2.5)	0	0	0	40
2h	30(96.8)	1(3.2)	0	0	0	31
4h	29(85.3)	4(11.8)	0	1(2.9)	0	34
6h	15(48.4)	16(51.6)	0	0	0	31
8h	3(10.0)	23(76.7)	4(13.3)	0	0	30
10h	4(11.4)	20(57.1)	11(31.4)	0	0	35
12h	3(6.8)	19(43.2)	22(50.0)	0	0	44
16h	0	0	10(41.7)	10(41.7)	4(16.7)	24
20h	0	0	4(12.5)	7(21.9)	21(65.6)	32
24h	0	0	5(14.3)	0	30(85.7)	35
26h	0	0	6(17.1)	0	29(82.9)	35
山羊卵母细胞						
0h	24(88.9)	0	1(3.7)	0	2(7.4)	27
2h	16(88.9)	1(5.6)	1(5.6)	0	0	18
4h	22(81.5)	4(14.8)	1(3.7)	0	0	27
6h	8(38.1)	13(61.9)	0	0	0	21
8h	8(26.7)	22(73.3)	0	0	0	30
10h	2(5.7)	16(45.7)	15(42.9)	0	2(5.7)	35
12h	1(3.0)	12(36.4)	20(60.6)	0	0	33
16h	0	0	15(34.9)	18(41.9)	10(23.2)	43
20h	2(5.4)	0	3(8.1)	1(2.7)	31(83.8)	37
24h	0	0	3(13.6)	0	19(86.4)	22
26h	2(3.1)	0	8(12.5)	0	54(84.4)	64
绵羊卵母细胞						
0h	39(95.1)	1(2.5)	0	0	1(2.4)	41
2h	42(93.3)	3(6.7)	0	0	0	45
4h	51(100.0)	0	0	0	0	51
6h	23(56.1)	18(43.9)	0	0	0	41
8h	10(28.6)	22(62.6)	3(8.6)	0	0	35
10h	10(19.2)	23(44.2)	18(34.6)	1(1.9)	0	52
12h	2(4.8)	17(40.5)	23(54.8)	0	0	42
16h	3(7.7)	0	23(59.0)	10(25.6)	3(7.7)	39
20h	1(2.4)	0	6(14.3)	21(50.0)	14(33.3)	42
24h	0	0	8(15.7)	4(7.8)	39(76.5)	51
26h	5(9.6)	0	5(9.6)	3(5.8)	39(75.0)	52

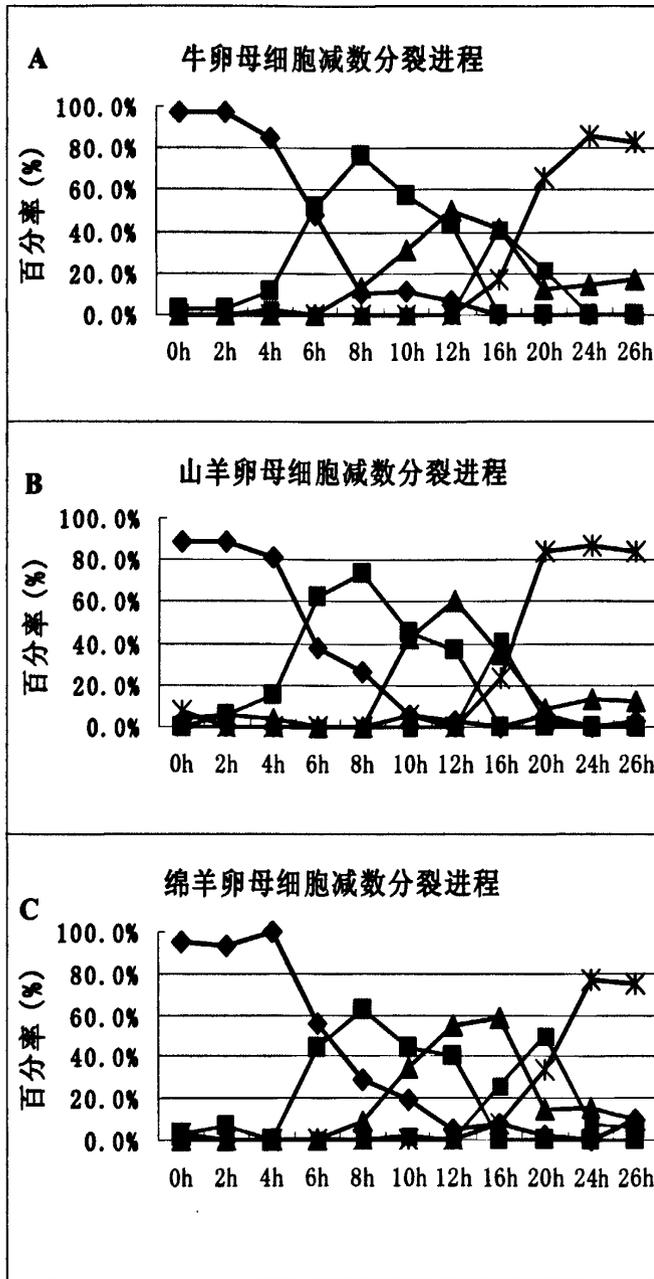


图 2-1 体外成熟过程中牛、山羊、绵羊卵母细胞的核成熟进程

GV: 生发泡期

Pre-MI: 前中期 I

MI: 中期 I

AI: 后期 I/末期 I

MII: 中期 II

Fig. 2-1 Nuclear maturation process of oocytes from bovine, goat and ovine during in vitro maturation

GV: germinal vesicle stage

Pre-MI: prometaphase I

MI: metaphase I

AI: anaphase I/teelophase I

MII: metaphase II

2.2 染色体和纺锤体的形态学变化

分别对三种动物的GV期、前中期I (Pre-MI)、中期I (MI)、后期I/末期I (AI/TI)、第二次减数分裂中期 (MII) 的卵母细胞进行了细胞核和细胞骨架的免疫荧光染色分析。三种动物各时期的特征基本相似,但也存在一些区别。

共同点: 在GV期,卵母细胞中检测不到微管结构(图2-2A,A',A'')。发生GVBD后,在前中期I,可观察到与凝集的染色体相关连的微管星体(图2-2B,B',B'')。MI期,染色体

和微管组装成纺锤体，凝集的染色体整齐地排列在中期板上（图2-2C,C',C''）。后期刚刚开始的时候，同源染色体分开，此时还可以分辨单个染色体，纺锤体呈对称的桶状（图2-2D,D',E',D''）。随着进一步向后推移，纺锤体两极的单倍体染色体组各凝集成一团，单条染色体不可分辨，纺锤体也逐渐由对称状态向不对称状态变化，中间体（midbody）向一端迁移（图2-2E,F',E'',F,G',F''）。等到末期，中间体两侧的微管与染色体的接触面一边宽、一边窄，之后微管从接触面窄的一侧与染色体脱离（图2-2G,G''）。紧接着卵母细胞完成成熟过程到达MII期，排出第一极体，大量的微管分布于极体中（图2-2H,H',H''）。

除了上述相同的特征，牛、山羊和绵羊卵母细胞的核和纺锤体在成熟过程中也显示出不同的特点。GV期，绵羊卵母细胞呈现三种核型：（1）核较大，细丝状的染色质弥散在整个生发泡内（图2-3A）；（2）弥散的丝状染色质分布在整個核区，核区有一个或两个核仁（图2-3B）；（3）核相对较小，染色较深，弥散程度低（图2-3C）。AI/II期，绵羊卵母细胞有一部分出现三极纺锤体，染色体呈现三团，其中一团体积较大，另外两团体积小且大小相当（图2-3D,E）。MII期，部分绵羊卵PB1中的染色体分成两团、三团甚至几团，有些由微管相互连接（图2-3F），有些则没有微管相连，形成两个极体样结构（图2-3G），这可能就是AI/II时期观察到的三极纺锤体的染色体相分离而来。MII期山羊大约有50%的卵PB1中的染色体不是呈凝集状态，而是分散成单个染色体（图2-3H）。

2.3 微丝分布的变化

在牛、山羊、绵羊卵母细胞成熟过程中微丝的分布没有差别，与已经报道的结果一致^[18]。从GV期到MI期，微丝主要在皮质层分布，胞质中基本没有明显的微丝分布，也不在染色体周围聚集（图2-4A,B,A',B',A'',B''）。AI期开始，在染色体周围逐渐出现聚集的微丝，形成纺锤体样结构（图2-4C,C',C''），第一次减数分裂完成时染色体周围微丝随极体排出，MII期染色体周围也观察不到微丝分布（图2-4D,D',D''）。

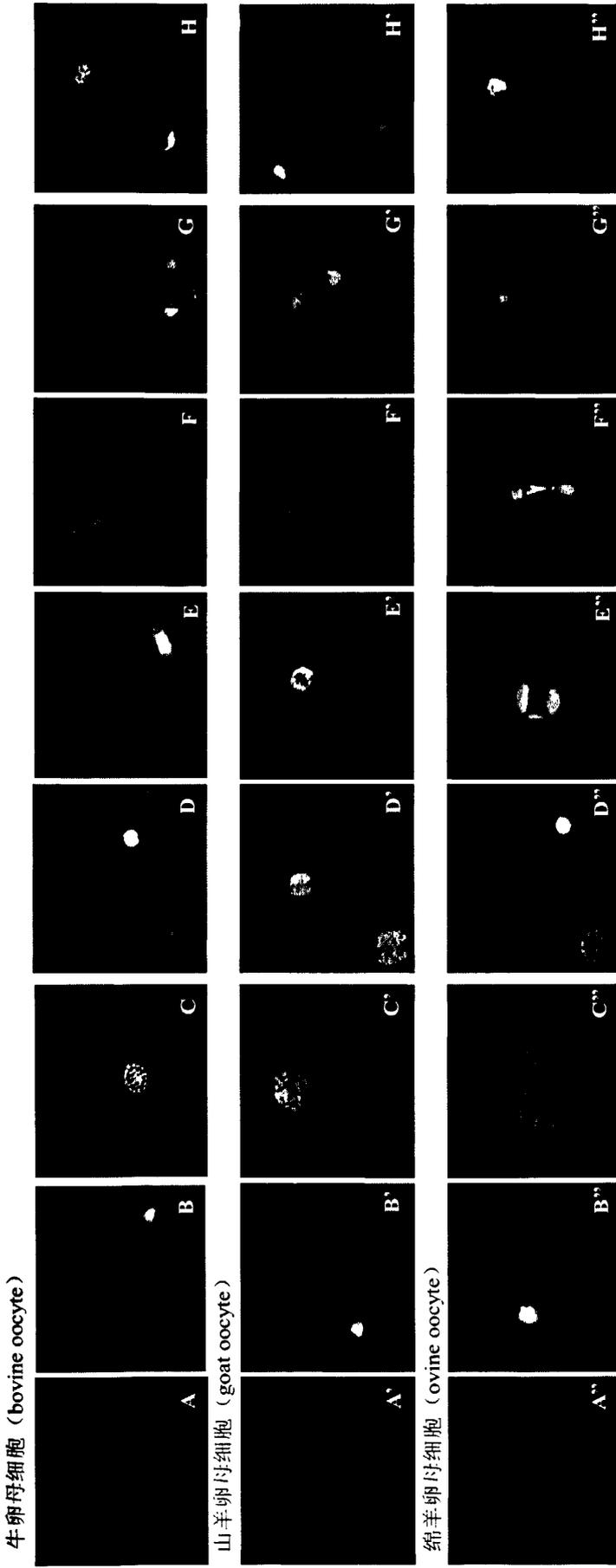


图 2-2 牛、山羊、绵羊卵母细胞减数分裂成熟过程中染色体和纺锤体形态学变化。

A-H: 牛卵母细胞GV-MII期; A'-H': 山羊卵母细胞GV-MII期; A''-H'': 绵羊卵母细胞GV-MII期

A,A',A'': GV期; B,B',B'': pre-MI期; C,C',C'': MI期; D,D',D'': 早AI期; E,E',E'': AI期; F,F',F'': AI/TI期; G,G',G'': TI期; H,H',H'': MII期。

红色: 染色体; 绿色: 微管蛋白

Fig.2-2 Morphological changes of chromosomes and spindles during maturation of oocytes from bovine, goat and ovine.

A-H: GV-MII stage oocytes of bovine oocytes; A'-H': GV-MII stage oocytes of goat oocytes; A''-H'': GV-MII stage oocytes of ovine oocytes

A,A',A'': GV stage; B,B',B'': pre-MI stage; C,C',C'': MI stage; D,D',D'': early AI stage; E,E',E'': AI stage; F,F',F'': AI/TI stage; G,G',G'': TI stage; H,H',H'': MII stage.

Red: chromosome; Green: microtubule.

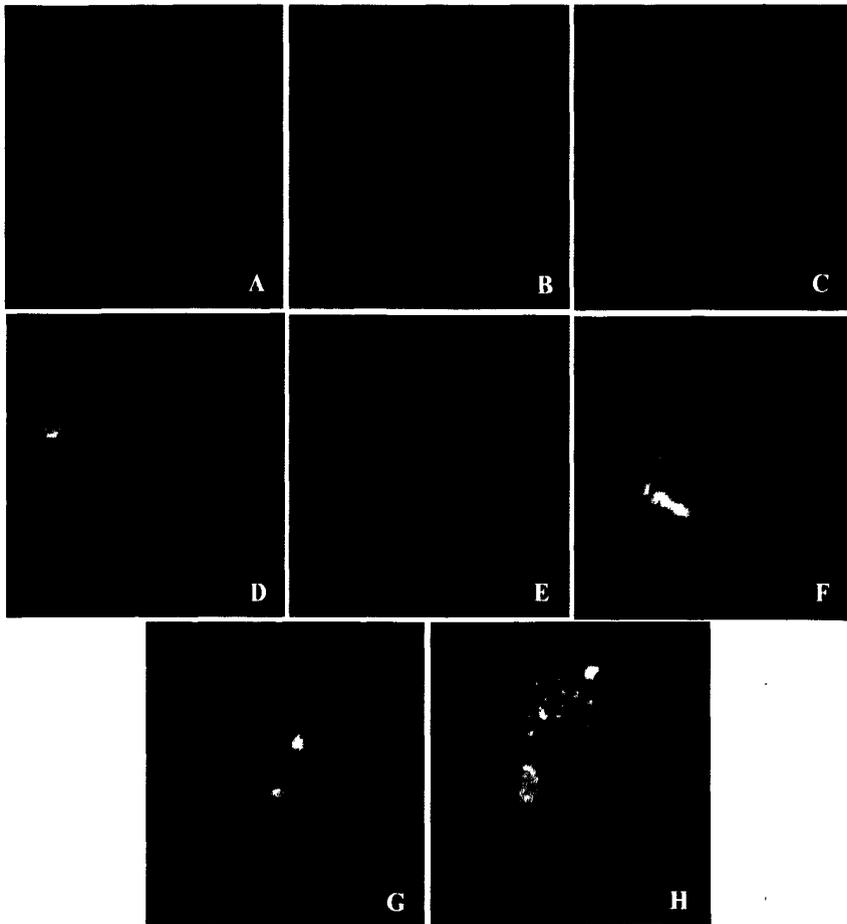


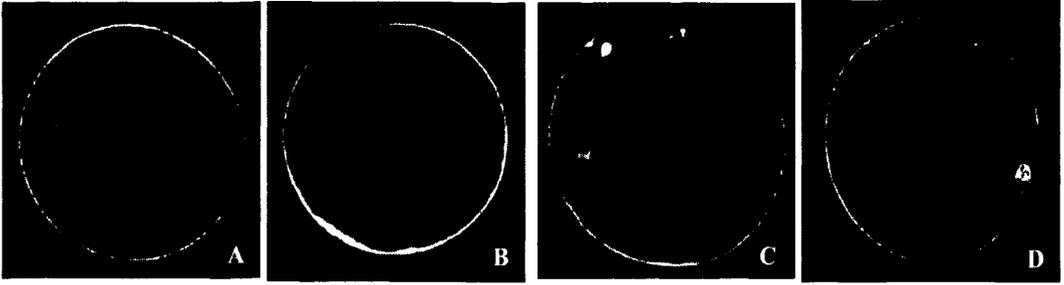
图 2-3 山羊和绵羊卵母细胞体外成熟过程中染色体和纺锤体呈现的不同于牛卵母细胞的其他特点

A-C: GV期绵羊卵母细胞; D-E: 绵羊卵母细胞AI/TI期的三极纺锤体; F-G: MII期绵羊卵母细胞; H: MII期极体内染色体分散的山羊卵母细胞
 红色: 染色体; 绿色: 微管

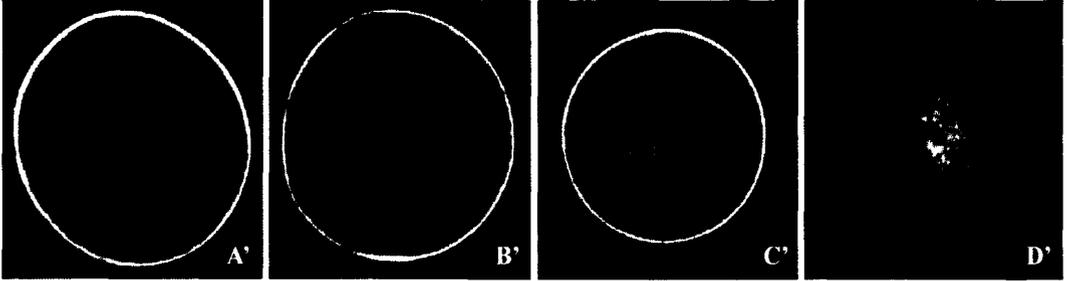
Fig. 2-3 Characteristics of chromosomes and spindles of goat and ovine oocytes that different from bovine oocytes during in vitro maturation

A-C: GV stage ovine oocytes; D-E: tripolar AI/TI spindles of ovine oocytes; F-G: MII stage ovine oocytes; H: MII oocytes of goat with dispersed chromosomes in polar body
 Red: chromosome; Green: microtubule.

牛卵母细胞 (bovine oocyte)



山羊卵母细胞 (goat oocyte)



绵羊卵母细胞 (ovine oocyte)

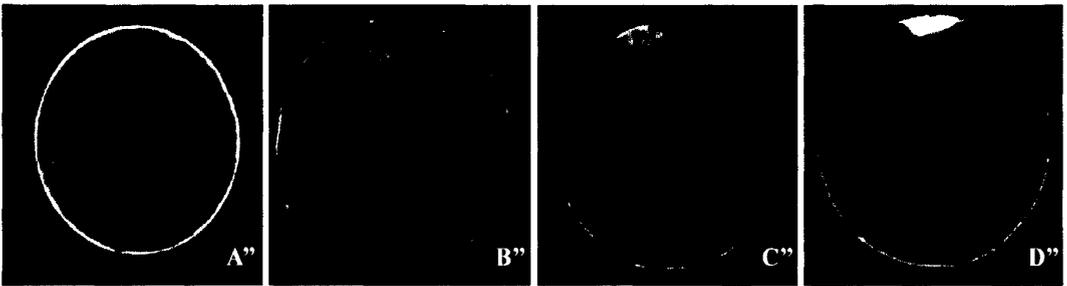


图 2-4 牛、山羊、绵羊卵母细胞体外成熟过程中微丝的分布变化。

A-D: GV-MII期牛卵母细胞微丝分布; A'-D': GV-MII期山羊卵母细胞微丝分布; A''-D'': GV-MII期绵羊卵母细胞微丝分布。红色: 染色体; 绿色: 微丝

Fig. 2-4 Dynamic changes of microfilaments of oocytes from bovine, goat and ovine during in vitro maturation.

A-D: microfilament distribution in bovine oocytes at GV-MII stages; A'-D': microfilament distribution in goat oocytes at GV-MII stages; A''-D'': microfilament distribution in ovine oocytes at GV-MII stages.

Red: chromosome; Green: microtubule.

3. 讨论

随着家畜细胞核移植、转基因和胚胎干细胞等技术的发展,对卵子质量的要求越来越高,卵子的来源和质量是体外成熟培养技术体系的关键因素之一。卵母细胞发育成熟是一个极其复杂的过程,受卵泡内外环境许多因素的影响,而体外培养系统尚不完善,导致卵母细胞的体外成熟质量不高,进而制约胚胎工程技术的研究与应用。了解实验条件下卵母

细胞减数分裂核发育进程能为更有效的开展核移植操作奠定基础。哺乳动物卵母细胞恢复减数分裂后的核成熟进程研究在小鼠^[24]、人^[25]、猪^[26]、牛^[18,27]、绵羊^[28]、山羊^[29]、马^[30]和猫^[31]等动物中已经有报道。本实验对牛、山羊、绵羊在本实验室条件下体外成熟过程中核成熟进程进行了分析对比,牛卵成熟进程与已报道结果相似。牛和山羊成熟进程基本相似(图2-1A,B),而绵羊的核成熟似乎比牛和山羊的核成熟慢(图2-1C)。已报道结果多将卵泡按其直径大小分类后进行研究^[26,29],但在通常的胚胎工程实验中,牛卵母细胞的回收由于可用注射器抽取,可以区分不同大小卵泡,但是绵羊和山羊卵母细胞一般通过切割法回收卵母细胞,因此不容易区分不同大小卵泡,而且区分过程比较费时,体外暴露时间延长必然影响体外成熟结果。因此在不按直径进行分类的情况下了解其体外成熟进程对于更好的把握体细胞核移植的时间切点进而提高核移植效率具有重要意义。

哺乳动物卵母细胞的减数分裂成熟过程中,微管和微丝等细胞骨架的组织 and 结构发生了一系列明显的变化,从而为染色体重组和细胞分裂提供了一个框架。微管和微丝的组装与解聚的动态变化研究已在爪蟾^[32,33]、果蝇^[34]、酵母^[35]和许多哺乳动物中都有报道^[18,36-40]。本实验通过免疫荧光染色方法检测了牛、山羊、绵羊三种家畜动物卵母细胞减数分裂成熟过程中纺锤体微管、染色体和微丝的动态变化。从形态上看,三种动物卵母细胞在整个成熟过程中细胞骨架的动态变化基本一致(图2-2)。微管在GVBD后开始在染色体周围组装,逐渐形成中期纺锤体,到后期时分布于分离的两组同源染色体之间,呈对称的桶状;随着进入末期,微管纺锤体不再呈对称状态,中间体(midbody)向一端迁移,中间体两侧的微管与染色体的接触面一边宽、一边窄,之后微管从接触面窄的一侧与染色体脱离。紧接着卵母细胞完成成熟过程到达MII期,排出第一极体,大量的微管分布于极体中。家畜动物卵母细胞纺锤体的形状与小鼠^[36]的有所差别,小鼠中期纺锤体有相对比较明显而集中的纺锤体极,但家畜动物的纺锤体极不集中,比较宽;在开始进入后期时,小鼠卵母细胞中微管除了分布于两组同源染色体间,还在染色体另一侧分布,可能起到牵引作用,家畜动物中后期只在分离的染色体间分布。这些不同点说明家畜动物卵母细胞减数分裂与小鼠在微管作用方面可能存在一定差别。本实验结果发现,家畜动物卵母细胞两组同源染色体在后期从比较明显的可数状态变成末期不可数的凝集状态。这可能是保证染色体准确分离的机制之一。可能纺锤体检验点在这个过程中发挥了作用。减数分裂过程中染色体的正常分离对卵母细胞的正常发育至关重要。纺锤体检验点是阻止染色体发生错误分离的一个质量监控系统,其通过检测纺锤体微管的缺陷、有丝分裂或减数分裂的染色体不正常的配对或偶联以及动粒不正确的定向,阻止染色体分离的启动,从而避免染色体的错误分离及含有非整

倍染色体子细胞的形成^[41]。染色体的高度凝集可能保证了染色体在分离过程中不会因为散在分布而丢失,也说明从后期开始时有一些分子逐渐被募集到染色体周围,并逐渐将各组同源染色体分别聚集在一起,而在极体排出之后又有相关机制使这些分子失去作用,从而形成第二次减数分裂中期纺锤体。这些机制都是值得我们进一步深入研究的。

除了共同特征,三种动物间纺锤体动态变化也存在一些差别。绵羊卵母细胞的GV核呈现三种形态,其中核比较大,染色质弥散分布和核中有核仁的两种(图2-3A,B)可能是发育能力较强的两种,因为前者占大多数,后者次之。而核较小、染色深、弥散程度低(图2-3C)的一种可能发育能力较差,因为这种卵很少,而且体积偏小,在长时间培养后未发生GVBD的卵中有一部分核是这种形态的,另外两种形态的少。绵羊有部分卵母细胞AI/II期出现三极纺锤体(图2-3D,E),染色体呈现一大两小三团,这可能是在体外成熟过程中负责将染色体凝集在一起的分子功能发挥出现异常,无法将其中一组同源染色体完全凝集在一起。两小团染色体最终都是进入极体的,极体染色体分成两团、三团甚至几团,有些由微管相互连接(图2-3H),有些则没有微管相连(图2-3L),形成两个极体样结构。这种类型的卵母细胞极体较扁。有人对人卵母细胞的第一极体进行形态评分^[42]:1级,完整、圆、表面光滑;2级,完整、表面粗糙;3级,不完整、碎片。认为1级的第一极体卵母细胞受精率高于2级和3级第一极体的卵母细胞,并且胚胎质量也比较好。可能绵羊中极体扁的卵母细胞也代表了质量相对差的一部分卵母细胞。但是,Ebner^[43]则认为第一极体的形态和受精无关。山羊MII期卵母细胞有一部分极体中染色体呈可数状态(图2-3F),这可能极体中也分布了MII期将同源染色体解聚成单个染色体的分子,从而使极体中染色体呈单个分布。

微丝对核的迁移和极体的排放起很重要的作用^[17,44-46]。用细胞松弛素B处理小鼠卵母细胞^[45]不影响GVBD的发生,并且GVBD后减数分裂纺锤体能够形成。但是,减数分裂纺锤体和染色质不能迁移到细胞皮质区,极体的排放被抑制。本实验对三种家畜动物卵母细胞微丝分布的观察结果与已报道的牛的结果^[18]相同(图2-4),卵母细胞从GV期到MI期微丝分布在质膜下方皮质区,从后期开始在染色体周围出现微丝分布,微丝围绕着染色体,最终染色体周围的微丝绝大部分随第一极体排出。

本实验结果表明,牛、山羊、绵羊的卵母细胞在体外成熟过程中细胞骨架和染色体的动态变化基本相同;牛和山羊体外成熟时核的成熟进程相似,绵羊的成熟进程略慢于牛和山羊。这为把握体细胞核移植操作的最佳时间点进而提高核移植效率具有重要意义。

参考文献:

- [1] Erickson GF and Sorensen RA. In vitro maturation of mouse oocytes isolated from late, middle, and pre-antral graafian follicles. *Journal of Experimental Zoology* 1974; 190:123-127.
- [2] Sorensen RA and Wassarman PM. Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. *Developmental Biology* 1976, 50:531-536.
- [3] Mehlmann LM, Saeki Y, Tanaka S, Brennan TJ, Evsikov AV, Pendola FL, Knowles BB, Eppig JJ, Jaffe LA. The Gs-linked receptor GPR3 maintains meiotic arrest in mammalian oocytes. *Science* 2004, 306:1947-1950.
- [4] Dufresne L, Neant I, St-Pierre J, et al. Effect of 6-dimethylaminopurine on microtubules and putative intermediate filaments in sea urchin embryos. *J. Cell Sci.* 1991, 99: 721-730.
- [5] Pokrywka NJ, Stephenson EC. Microtubules are a general component of mRNA localization systems in *Drosophila* oocytes. *Dev. Biol.* 1995, 167: 363-370.
- [6] Webb M, Howlett SK, Marot B. Parthenogenesis and cytoskeletal organization in aging mouse eggs. *J. Embryol. Exp. Morph.* 1986, 95: 131-145.
- [7] Cao LG, Wang YL. Mechanism of the formation of contractile ring in dividing cultured animal cells. II. Cortical movement of microinjected actin filaments. *J. Cell Biol.* 1990, 111: 1905-1911.
- [8] Barton NR, Goldstein LSB. Going mobile: Microtubule motors and chromosome segregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93:1735-1742.
- [9] Brunet S, Vernos I. Chromosome motors on the move. *EMBO Rep* 2001, 2:669-673.
- [10] Wittmann T, Hyman A, Desai A. The spindle: A dynamic assembly of microtubules and motors. *Nat Cell Biol* 2001, 3: E28-E34.
- [11] Maro B, Howlett SK, Webb M. Non-spindle microtubule organizing centers in metaphase II-arrested mouse oocytes. *J Cell Biol*, 1985, 101:1665-1672.
- [12] Schatten G, Simerly C, Schatten H. Microtubule configurations during fertilization, mitosis, and early development in the mouse and the requirement for egg microtubule-mediated motility during mammalian fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82: 4152-4156.
- [13] Brunet S, Maria AS, Guillaud P, Dujardin D, Kubiak JZ, Maro B. Kinetochore fibers are not involved in the formation of the first meiotic spindle in mouse oocytes, but control the exit from the first meiotic M phase. *J Cell Biol* 1999, 146: 1-11.
- [14] Combells CMH, Albertini DF. Microtubule patterning during meiotic maturation in mouse oocytes is determined by cell cycle specific sorting and redistribution of γ -tubulin. *Dev Biol* 2001, 239: 281-294.
- [15] Sanfins A, Lee GY, Plancha CE, et al. Distinctions in meiotic spindle structure and assembly during in vitro and in vivo maturation of mouse oocytes. *Biol Reprod* 2003, 69: 2059-2067.
- [16] Simerly C, Navara C, Wu GJ, et al. Cytoskeletal organization and dynamics in mammalian oocytes during maturation and fertilization. In: Grudzinskas JG, Yovich JL, editors. *Gametes-The oocyte*. Cambridge: Cambridge University Press. 1995, pp 54-94.
- [17] Sun QY, Lai LX, Park KW, et al. Dynamic events are differently mediated by microfilaments, microtubules, and mitogen-activated protein kinase during porcine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Biol Reprod* 2001, 64:879-889.

- [18] Li GP, Liu Y, Bunch TD, et al. Asymmetric division of spindle microtubules and microfilaments during bovine meiosis from metaphase I to metaphase III, *Mol Reprod Dev*, 2005, 71:220-226
- [19] Albertini DF, Barrett SL. The developmental origins of mammalian oocyte polarity. *Semin Cell Dev Biol* 2004, 15: 599-606.
- [20] Krisher RL, Bavister BD. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogenology*, 1998, 49(1):103-114.
- [21] Yang X, Kubota C, Suzuki H, et al. Control of oocyte maturation in cows-biological factors. *Theriogenology*, 1998, 49:471-482
- [22] Savard C, Novak S, Saintcry A, et al. Comparison of bulk enucleation methods for porcine oocytes. *Mol Reprod Dev*, 2004, 67(1): 70-76.
- [23] Dominko T, Chan A, Simerly C, et al. Dynamic imaging of the metaphase II spindle and maternal chromosomes in bovine oocytes: implications for enucleation efficiency verification, avoidance of parthenogenesis, and successful embryogenesis [J]. *Biol Reprod*, 2000, 62(1): 150-154.
- [24] Fulka J Jr, Motlik J, Fulka J, et al. Effect of cycloheximide on nuclear maturation of pig and mouse oocytes, *Reprod Fertil*, 1986, 77:281-285
- [25] 赵涵, 李媛, 高选, 陈子江. 人类卵母细胞减数分裂进程及形态学研究. *解剖学报*, 2006(4): 479-483
- [26] 黄雅琼, 石德顺, 张晓溪等. 猪卵母细胞体外成熟过程中的减数分裂进程. *中国细胞生物学学报*, 2010, 32(1): 84-90
- [27] Sirard MA, Florman HM, Leibfried-Rutledge ML, et al. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes, *Biol Reprod*, 1989, 40:1257-1263
- [28] Moor RM, Crosby IM. Protein requirements for germinal vesicle breakdown in ovine oocytes, *Embryol Exp Morphol*, 1986, 94:207-220
- [29] 马所峰, 罗明玖, 苗义良等. 山羊卵母细胞的减数分裂进程, *实验生物学报*, 2004, 37:9-13
- [30] Willis P, Caudle AB, Fayrer-Hosken RA. Equine oocyte in vitro maturation: influences of sera, time, and hormones, *Mol Reprod Dev*, 1991, 30:360-368.
- [31] Goodrowe KL, Hay M, King WA. Nuclear maturation of domestic cat ovarian oocytes in vitro, *Biol Reprod*, 1991, 45:466-470
- [32] Gard DL. Microtubule organization during maturation of *Xenopus* oocytes: assembly and rotation of the meiotic spindles, *Dev Biol*, 1992, 151:516-530
- [33] Roeder AD, Gard DL. Confocal microscopy of F-actin distribution in *Xenopus* oocytes, *Zygote*, 1994, 2: 111-124
- [34] Riparbelli MG, Callaini G. Meiotic spindle organization in fertilized *Drosophila* oocyte: presence of centrosomal components in meiotic apparatus, *Cell Sci*, 1996, 109: 911-918
- [35] Palmer RE, Sullivan DS, Huffaker T, et al. Role of astral microtubules and actin in spindle orientation and migration in the budding yeast, *Cell Biol*, 1992, 119: 583-593
- [36] Sanfins A, Lee GY, Plancha CE, et al. Distinctions in meiotic spindle structure and assembly during in vitro and in vivo maturation of mouse oocytes, *Biol Reprod*, 2003, 69: 2059-2067
- [37] Tremoleda JL, Schoevers EJ, Stout TA, et al. Organization of the cytoskeleton during in vitro maturation

of horse oocytes, *Mol Reprod Dev*, 2001, 60: 260–269

- [38] Kim NH, Cho SK, Choi SH, et al. The distribution and requirements of microtubules and microfilaments in bovine oocytes during in vitro maturation, *Zygote*, 2000, 8: 25–32
- [39] Maro B, Johnson MH, Pickering SJ, et al. Changes in actin distribution during fertilization of the mouse egg, *Embryol Exp Morphol*, 1984, 81: 211–237
- [40] Verlhac MH, Kubiak JZ, Clarke HJ, et al. Microtubule and chromatin behavior follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes, *Development*, 1994, 120: 1017–1025
- [41] Shonn MA, McCarroll R, Murray AW Requirement of the spindle checkpoint for proper chromosome segregation in budding yeast meiosis. *Science*, 2000, 289: 300–303
- [42] Ebner T, Yaman C, Moser M, Sommergruber M, Feichtinger O, Tews G. Prognostic value of first polar body morphology on fertilization rate and embryo quality in intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 2000 Feb;15(2): 427–30.
- [43] Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Yaman C, Pfeleger U, Tews G. First polar body morphology and blastocyst formation rate in ICSI patients. *Hum Reprod*. 2002 Sep;17(9): 2415–8.
- [44] Zhu ZY, Chen DY, Li JS, et al. Rotation of meiotic spindle is controlled by microfilaments in mouse oocytes, *Biol Reprod*, 2003, 68: 943–946
- [45] Longo FJ, Chen DY. Development of cortical polarity in mouse eggs: Involvement of the meiotic apparatus, *Dev Biol*, 1985, 107: 382–394
- [46] Ryabova LV, Betina MI, Vassetzky SG. Influence of cytochalasin B on oocyte maturation in *Xenopus laevis*, *Cell Differ*, 1986, 19: 89–96.

第三章 细胞松弛素 B (CB) 对牛卵母细胞成熟和

二倍染色体卵母细胞形成的影响

前言

纤维状肌动蛋白 (F-actin) 即微丝 (microfilament, MF) 遍及所有类型的细胞 (包括配子), 并且使细胞体现出独特的特征。细胞内都有一个很大的非纤维状肌动蛋白 (G-actin) 库, 用于维持当细胞在承受环境变化时快速组装成 F-actin 的能力^[1]。细胞骨架的组装和去组装, 尤其是微管和微丝的组装, 在减数分裂纺锤体形成、染色体排列和分离、核物质从细胞中心向皮质区迁移以及 PB1 和 PB2 排出等过程的调控中起到关键作用^[2,3]。对牛卵母细胞成熟过程的研究显示, 几乎所有的 MTs 和 MFs 在牛卵母细胞减数分裂过程中都随着 PB1 和 PB2 的排出而排出^[4]。

微丝参与卵母细胞减数分裂过程中的多个细胞动力学事件。除了牵引纺锤体迁移, 还介导皮质颗粒向皮质区的移动、皮质纺锤体锚定、同源染色体分离、参与胞质分裂收缩环的形成等^[3]。利用一些抑制剂来处理体细胞和卵母细胞是研究微管和微丝的组装和功能的常用方法。细胞松弛素 B 是第一个用于研究细胞骨架的药物, 它是真菌分泌的生物碱。细胞松弛素 (细胞松弛素 B 及其衍生物) 在细胞内同微丝的正端结合, 并引起 F-肌动蛋白解聚, 阻断亚基的进一步聚合。当将细胞松弛素加入到活细胞后, 肌动蛋白纤维骨架消失, 使动物细胞的各种活动瘫痪, 包括细胞的移动、吞噬作用、胞质分裂等。在小鼠^[5-7]和猪^[8]卵母细胞减数分裂过程中用引起微丝解聚的药物 CB 或 CD 破坏或抑制 MF 组装不会抑制卵母细胞发生 GVBD, 但是导致极体 (polar body, PB) 排出的失败。当小鼠卵母细胞用 CD 处理, 同源染色体能够发生分离, 形成两个减数分裂纺锤体, 但是最终不能发生胞质分裂, 两个纺锤体又相互靠近融合形成一个大的纺锤体^[6]。在猪上, CB 处理引起的现象与小鼠中相似^[8]。用尼古丁处理牛卵母细胞也观察到类似的现象, 并且尼古丁处理导致二倍体卵母细胞形成^[9]。本研究用不同浓度的细胞松弛素 B 处理牛卵母细胞后, 对卵母细胞的成熟、减数分裂纺锤体形成的动态变化、卵母细胞最终的染色体组成等进行了研究。

1. 材料与方法

1.1 材料

材料及牛卵母细胞培养液同第一章材料。

1.2 方法

1.2.1 牛卵母细胞的体外成熟

方法同第一章。根据实验需要在成熟液中添加 CB。

1.2.2 微管和微丝的免疫荧光染色

分别收集不同实验组的卵母细胞，固定液固定，进行微管和微丝的免疫荧光染色。染色方法同第一章。

1.2.3 卵母细胞染色体分析

根据实验需要收集各组卵母细胞。将去除卵丘细胞的卵母细胞在 0.8% 的柠檬酸钠溶液中低渗处理 3-5min，然后 2-3 枚一组在少量液体中置于载玻片上，快速在其上滴加 1-2 滴固定液（甲醇:冰乙酸=3:1）使卵固定并破裂释放出染色体。晾干 24h 以上，使染色体在载玻片上粘牢之后用 1:100 稀释的吉姆萨染液染色 30min，清水冲洗去除残留染液，晾干后封片，正置显微镜（Nikon 80I）下观察并照相。

1.2.4 实验设计

- (1) 在成熟液中添加 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、7.5 和 10.0 $\mu\text{g/ml}$ 的 CB 处理牛卵母细胞 24h（全程处理）后，检测 CB 对成熟率和染色体组成的影响。通过 PB1 的存在来判断卵母细胞的成熟。有 PB1 和无 PB1 的卵母细胞用于进行染色体分析。
- (2) 卵母细胞用含 7.5 和 15 $\mu\text{g/ml}$ CB 的成熟液分别处理 6、8、10h（预处理）。然后彻底清洗卵母细胞，并用正常成熟液继续培养到 24。检查极体排出情况。本实验用于确定用 CB 预处理卵母细胞是否影响成熟。
- (3) 成熟中的卵母细胞用 CB 处理。COC 首先在正常成熟液中培养 10h。此时的卵母细胞主要出于前中期，将它们转移到含有 1.0、3.0、5.0 和 7.5 $\mu\text{g/ml}$ CB 的培养液中培养至 24h（后处理）。然后检测卵母细胞的成熟情况。
- (4) 由实验（3）结果知道 CB 后处理会影响卵母细胞成熟。COCs 首先在正常培养液中培养 10h，然后转入含 7.5 $\mu\text{g/ml}$ CB 的培养液中，分别培养至 24h、30h、36h、48h，然后检测细胞染色体组成。本实验的目的是分析是否随着 CB 中培养时间延长分开的染色体合成一个大纺锤体的几率增加。

1.2.5 数据分析

体外成熟实验每组重复三次以上。各组的成熟率和染色体组成用 t-检验方法进行比较。

2. 结果

2.1 CB 处理 24h 对牛卵母细胞成熟和染色体单倍性的影响

用 CB 处理牛卵母细胞 24h 的结果显示, CB 以剂量依赖的方式影响卵母细胞成熟和染色体数的单倍性。当 CB 浓度 $\leq 1.0 \mu\text{g/ml}$ 时, 卵母细胞的成熟率与对照组无显著差异 (83%-85%), 但是, 当浓度为 $2.0 \mu\text{g/ml}$ 和 $5.0 \mu\text{g/ml}$ 时成熟率为 44.8% 和 29%, 显著低于对照组 ($P < 0.05$), 浓度达到 $7.5 \mu\text{g/ml}$ 和 $10.0 \mu\text{g/ml}$ 时所有卵都没有排出 PB1 (见表 3-1)。

对排出 PB1 的卵母细胞进行染色体分析显示, CB 浓度 $\leq 1.0 \mu\text{g/ml}$ 时, 88%-95% 的卵母细胞染色体数是单倍的 ($n=30$), 浓度为 $2.0 \mu\text{g/ml}$ 时单倍性显著下降 (74%, $P < 0.05$), 浓度达到 $5.0 \mu\text{g/ml}$ 时, 只有约 50% 的细胞是单倍性的 (见表 3-1)。

对未排 PB1 的细胞进行染色体分析发现, 50% 以上的卵母细胞染色体呈二倍性 ($2n=60$) (见表 3-1), 包括两组 30 条染色体 (图 3-1D-G) 或者是一组 60 条染色体 (图 3-1H-L)。

表3-1 不同浓度CB处理24h后卵母细胞的成熟率和有PB1卵母细胞的染色体组成

Table 3-1 Maturation of oocytes incubated in CB-containing medium at different concentrations for 24 h and chromosomal analysis of the oocytes with PB1

CB ($\mu\text{g/ml}$)	卵母细胞数 No. oocytes	有 PB1 卵 Oocytes with PB1 (%)	有 PB1 卵母细胞的染色体状态 Chromosome status of PB1 oocytes			
			数目 No.	N=30	n>30	N<30
Control	89	74 (83.1) ^a	65	61 (93.8) ^a	0	4 (6.2)
0.1	127	112 (88.2) ^a	87	83 (95.4) ^a	1 (1.1)	3 (3.4)
0.2	121	103 (85.1) ^a	77	68 (88.3) ^a	2 (2.6)	7 (9.1)
0.5	119	103 (86.6) ^a	82	72 (87.8) ^b	8 (9.8)	2 (2.4)
1.0	131	111 (84.7) ^a	90	82 (91.1) ^b	6 (5.4)	2 (2.2)
2.0	116	52 (44.8) ^c	46	34 (73.9) ^b	5 (10.9)	7 (15.2)
3.0	121	42 (34.7) ^c	36	21 (58.3) ^c	4 (11.1)	11 (30.6)
5.0	109	32 (29.4) ^c	25	13 (52) ^c	4 (16)	8 (32)
7.5	110	0	0	0	0	0
10.0	121	0	0	0	0	0

同一列中不同的上标数值表示有显著性差异。a, b 和 b, c: $P < 0.05$; a, c: $P < 0.01$.

Values with different superscripts within the same column differ significantly. a, b and b, c: $P < 0.05$; a, c: $P < 0.01$.

表3-2 不同浓度CB处理24h未排极体卵母细胞的染色体组成

Table 3-2. Chromosomal analysis of non-PB1 oocytes after incubation of oocytes in CB-containing media at different concentrations for 24h

CB ($\mu\text{g/ml}$)	总卵 数 Total	无 PB1 卵 数 No. w/o PB1 (%)	无 PB1 卵母细胞的染色体状态(%)					
			Chromosome status of oocytes without PB1 (%)					
			检测卵数 No. identified	MI	AI/TI*	2n 卵母细胞 2n oocytes		
						60	30+30	总数 Total
0	89	15(16.8) ^c	14	11(78.7) ^a	3(21.4) ^a	0	0	0
1.0	131	30(22.9) ^c	26	16(61.5) ^a	7(26.9) ^a	3(11.5) ^b	0	3(11.5) ^c
2.0	116	64(55.2) ^b	54	16(29.6) ^b	11(20.4) ^a	17(31.5) ^a	10(18.5) ^b	27(50) ^a
3.0	121	79(65.3) ^b	72	20(27.7) ^b	8(11.1) ^a	33(45.8) ^a	11(15.3) ^b	44(61.1) ^a
5.0	109	77(70.6) ^b	68	16(23.5) ^b	8(11.8) ^a	31(45.6) ^a	13(19.1) ^b	44(64.7) ^a
7.5	110	110(100) ^a	97	24(24.7) ^b	12(12.4) ^a	32(33.0) ^{ab}	29(29.9) ^b	61(62.9) ^a
10.0	121	121(100) ^a	101	28(27.7) ^b	11(10.9) ^a	28(27.7) ^{ab}	34(33.7) ^b	62(61.4) ^a

同一列中不同的上标数值表示有显著性差异。a, b 和 b, c: P<0.05; a, c: P<0.01.

Values with different superscripts within the same column are significantly different. a,b and b,c: P<0.05; a,c: p<0.01.

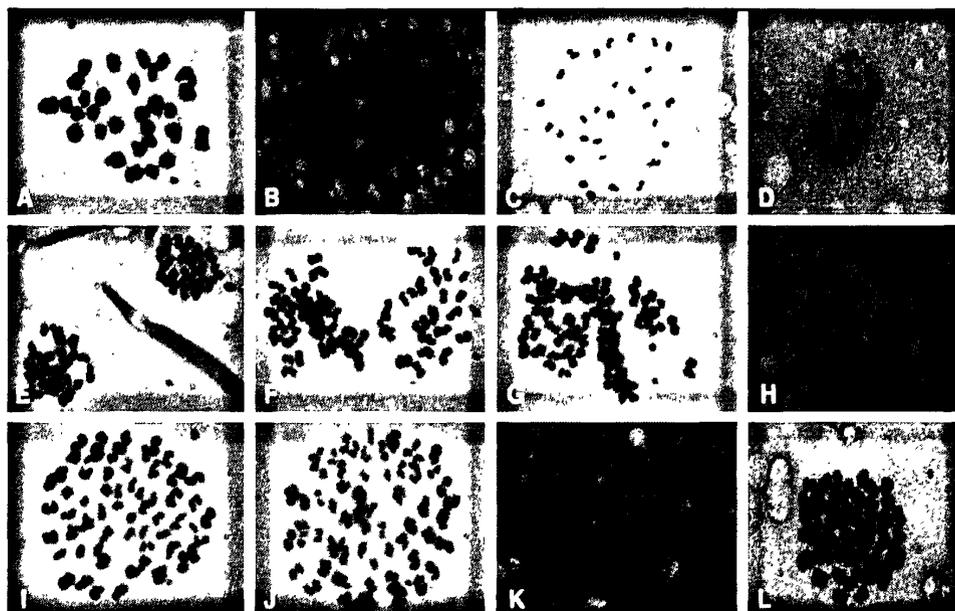


图3-1 卵母细胞在含有CB的培养液中培养后的染色体状态。(A, B)MI染色体；(C)MII染色体；(D)早AI期同源染色体分离；(E)两组30条染色体；(F, G)两组30条染色体的中期板相互靠近；(H-L)合并到一起的染色体， $2n(4c)=60$ 。1000 \times

Fig.3-1 Chromosomal state after the oocytes incubated in CB-containing media. (A, B) MI chromosomes; (C) MII chromosomes; (D) Homologous chromosomes separated in early anaphase I; (E) two 30-chromosomes in a cell; (F, G) the two 30 plates move together; (H-L) the merged chromosomes, $2n(4c)=60$. 1000 \times .

对成熟16h、20h、22h和24h的卵母细胞进行免疫荧光染色结果显示,与对照组卵母细胞相比(Fig. 3-2 A-E),CB处理细胞细胞呈现如下特征:(1)纺锤体微管变形,使纺锤体形状不规则(图3-2 F);(2)同源染色体分离后不发生胞质分裂,两组染色体形成两个纺锤体(图3-2G-J),这种现象在处理16h的时候开始出现,20h的时候最多,22-24h时减少;(3)在20h的时候,开始出现一个超大纺锤体(图3-2 K-L),22-24h时数目达到最多。具有两个纺锤体和一个大纺锤体的卵母细胞与图3-1中30条染色体和60条染色体相对应,染色体数都是二倍的。

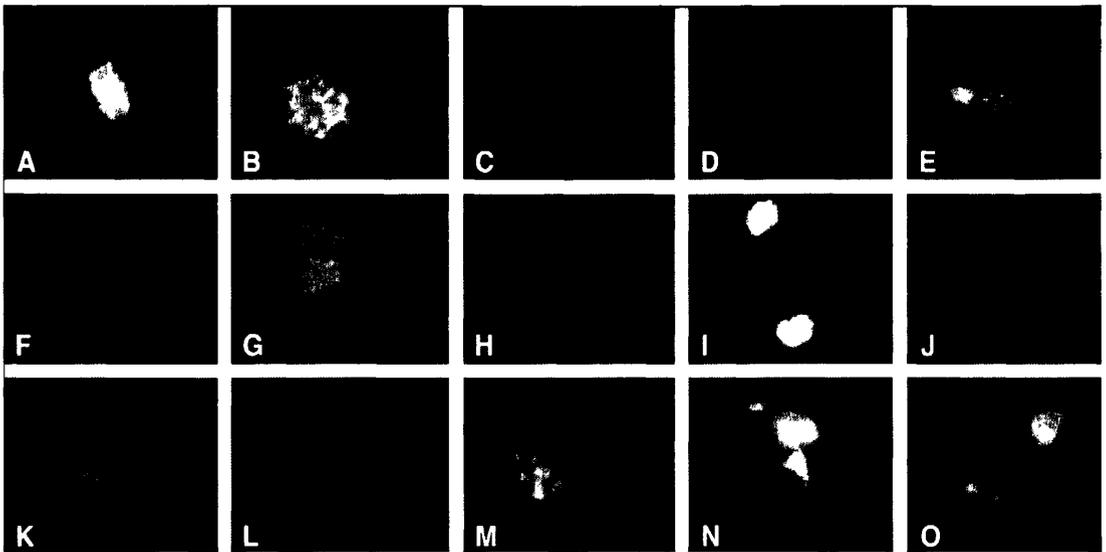


图3-2 CB处理卵母细胞的纺锤体形态。对照组MI期(A-C)、TI期(D)和MII期(E)卵母细胞。CB处理卵母细胞引起纺锤体不规则(F)、出现两个纺锤体(G-J)、合并到一起形成大纺锤体(K、L)、异常纺锤体(M-O)。630×

Fig. 3-2 Meiotic spindle morphology of oocytes treated by CB. Oocytes at MI (A-C), TI (D), and MII (E) in control oocytes. Cytochalasin B caused spindle irregular and expanded (F), two spindles (G-J), merged large spindle (K, L). Abnormal spindles (M-O). 630×.

2.2 CB 预处理 6-10h 对卵母细胞成熟的影响

在成熟培养的前 6-10h 用 CB 处理卵母细胞以时间依赖的方式影响卵母细胞成熟。用 7.5 和 15 $\mu\text{g/ml}$ 的 CB 预处理 6h 和 8h 得到的成熟率(约 80%)与对照组相近(83%)。当用 15 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度预处理 8h 时,成熟率显著下降(65.9%)。预处理时间延长到 10h 时,两个浓度的 CB 都导致成熟率显著下降(60%)(表 3-3)。

表3-3 成熟培养前期用CB处理对牛卵母细胞体外成熟的影响

Table 3-3 Effect of pretreatment with CB on in vitro maturation of bovine oocytes

处理方法 Treatment	CB ($\mu\text{g/ml}$)	卵母细胞数 No. oocytes	有 PB1 卵母细胞数 Oocytes with PB1(%)
正常成熟液中培养24h (对照)	0	116	96(82.8) ^a
CB 处理 6h 后正常成熟液中继续培养到 24h IVM in CB for 6hr then in NMM to 24hr	7.5 μg 15.0 μg	126 121	105(83.3) ^a 97(80.2) ^a
CB 处理 8h 后正常成熟液中继续培养到 24h IVM in CB for 8hr then in NMM to 24 hr	7.5 μg 15.0 μg	163 166	136(83.4) ^a 109(65.7) ^b
CB 处理 10h 后正常成熟液中继续培养到 24h IVM in CB for 10 hr then in NMM to 24 hr	7.5 μg 15.0 μg	139 145	82(59.0) ^b 87(60.0) ^b

同一列中不同的上标数值表示有显著性差异。a, b: $P < 0.05$.

Values with different superscripts in the same column differ significantly. a, b: $P < 0.05$.

2.3 CB 后处理对卵母细胞体外成熟的影响

所有后处理组中(表 3-4), 即使 CB 浓度低至 $1\mu\text{g/ml}$, 卵母细胞的成熟率(7.2%-69.6%)与对照组(84.9%)相比都显著下降($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$)。CB 浓度为 3.0、5.0 和 $7.5\mu\text{g/mL}$ 时, 有 58.5%-92.8%的卵母细胞没有排出 PB1。

表 3-4 不同浓度 CB 后期处理对卵母细胞体外成熟的影响

Table 3-4 In vitro maturation of oocytes posttreated at different concentrations with CB

CB 浓度($\mu\text{g/ml}$) CB concentration($\mu\text{g/ml}$)	培养卵母细胞数 No. oocytes incubated	有 PB1 卵数(%) No. with PB1 (%)
0(control)	285	242(84.9) ^a
1.0	336	234(69.6) ^b
3.0	400	166(41.5) ^c
5.0	399	125(31.3) ^c
7.5	346	25(7.2) ^c

同一列中不同的上标数值表示有显著性差异。a, b 和 b, c: $P < 0.05$; a, c: $P < 0.01$.

Values with different superscripts in the same column are significantly different. a, b and b, c: $P < 0.05$; a, c: $P < 0.01$.

2.4 延长 CB 后处理时间对卵母细胞染色体组成的影响

COCs 先在正常培养液中培养 10h, 然后转入含 7.5 $\mu\text{g/ml}$ CB 的培养液中, 分别培养至 24h、30h、36h、48h 后, 对没有排出极体的卵母细胞纺锤体进行免疫荧光染色观察细胞所处核相。结果发现, 在对照组中, 83.3% 的无 PB1 卵母细胞停滞在 MI 期, 16.7% 处于 AI/TI 期; 而延长 CB 后处理时间时, 只有极少数的卵母细胞排出 PB1 到达 MII 期, 无 PB1 卵中有 33%-36% 处于 MI 期, 另有 51.8%-62.3% 的卵母细胞染色体数是二倍的 ($4n=60$); 此外, CB 后处理至 30h 以上组 AI/TI 期卵的比例为 1.9-6.4%, 显著低于处理至 24h 组的 15.3%, 而由 60 条染色体组成的巨大纺锤体的卵数增加 (表 3-5)。

对未排 PB1 的卵母细胞进行染色体分析显示, 约 70% 同源染色体分离形成二倍染色体, 60 条染色体排列在赤道板上或形成两组各 30 条的染色体 (见表 3-6 和图 3-3)。部分卵母细胞处于 MI 期 (图 3-3F), 还有个别卵母细胞同源染色体分离不完全 (图 3-3L) 或染色体分离不均匀形成多组染色体 (图 3-3K)。在 CB 中培养到 30 以上, 形成 60 条染色体 (即形成巨大纺锤体) 的卵母细胞数显著高于处理 24h 组 (表 3-6)。

表 3-5 经 CB 处理不同时间未排第一极体的牛卵母细胞中纺锤体的形态

Table 3-5 Spindle morphology of the oocytes with no pb1 after incubation of oocytes in CB-containing media for different time.

组别 group	卵母细胞总数 No. oocyte	MI(%)	AI/TI(%)	异常纺锤体 Abnormal spindles			
				总数 (%) Total(%)	2-纺锤体 (%) 2-spindles(%)	巨大纺锤体(%) Huge spindle(%)	其它* Other*
对照	12	10(83.3)	2(16.7)	0	0	0	0
24h	85	28(32.9)	13(15.3) ^a	44(51.8)	15(17.6)	22(25.9)	7
30h	59	21(35.6)	2(3.4) ^b	36(61.0)	8(13.6)	24(40.7)	4
36h	53	19(35.8)	1(1.9) ^b	33(62.3)	8(15.1)	21(39.6)	4
48h	47	16(34.0)	3(6.4) ^b	28(59.6)	4(8.5)	17(36.2)	7

同一列中不同的上标数值表示有显著性差异。a,b: $p < 0.05$ 。*包括三极、四极纺锤体或染色体分离异常。

Values with different superscripts in the same column are significantly different. a,b: $p < 0.05$. *Including tripolar spindles, tetrapolar spindles and abnormal chromosome segregation.

表 3-6 CB 处理不同时间的牛卵母细胞染色体分析

Table 3-6 Chromosomal state analysis of bovine oocytes incubated in CB-containing media for different time.

组别 group	卵母细胞总数 No. oocyte	有 pb1	无 PB1 卵母细胞染色体倍性分析					
		卵 (%)	总数 Total	四分体 (%) Tetrad (%)	2n=60(%)	2n=2×30 (%)	2n 卵总数 2n oocyte	其它* Other*
		Oocytes with PB1 (%)						
对照	44	35(79.5)	9	8(88.9) ^a	1 (11.1) ^a	0	1(11.1) ^a	0
24h	48	3(6.3)	45	8(17.8) ^b	18 (40.0) ^b	14(31.1) ^a	32(71.1) ^b	5
30h	43	2(4.7)	41	9(22.0) ^b	24 (58.5) ^b	5(12.2) ^b	29(70.7) ^b	3
36h	56	2(3.6)	54	11(20.4) ^b	31 (57.4) ^b	7(13.0) ^b	38(70.4) ^b	5
48h	54	2(3.7)	52	8(15.4) ^b	26 (50.0) ^b	11(21.2) ^b	37(71.2) ^b	7

同一列中不同的上标数值表示有显著性差异。a,b: P<0.05。*包括同源染色体分离不完全或染色体分离不均匀，染色体成凝集状。

Values with different superscripts in the same column are significantly different. a,b: p<0.05. *Including incomplete or abnormal chromosomes, or chromosomes aggregate together.

3. 讨论

微丝是细胞骨架的一个成分，参与很多细胞学事件，在卵母细胞成熟和受精中起到非常重要的作用^[3,10-13]。我们对牛卵母细胞的研究显示，在 GV、GVBD、前中期 I 和中期 I 阶段微丝分布在质膜下的皮质区，在后期 I 之前在染色质区都没有分布。微丝从 AI 到 TI 期变得很明显。如同纺锤体微管的现象一样，微丝随着两组染色体中的一团排出到 PB1 中。在 PB1 排出过程中，几乎所有的微丝都随着极体排出，极体的染色质完全被微丝包围。在第二次减数分裂的 PB2 排出过程中也出现相同的现象^[4]。在本研究中，CB 处理不影响同源染色体的分离，但是纺锤体微管被破坏，染色体从中心向皮质区的迁移被抑制，最终抑制了 PB1 的排出。

微丝组装和聚合抑制剂如 CB、CD 和 LAT 通常用于细胞骨架的研究，尤其是微丝的形成和结构。在小鼠中，用 CB 处理卵母细胞导致卵母细胞停滞在 MI 期，但是不影响 GVBD、染色质凝集和纺锤体形成^[5]，但是破坏微丝并抑制了纺锤体的旋转、胞质分裂和极体排出^[7]。在猪上，用 1, 3 和 5μg/ml 的 CB 处理卵母细胞 44h 后^[8]，约 78%-91%的卵母细胞停滞在 MI 期，这说明 1 μg/ml 的 CB 就足以抑制 PB1 的排出。在牛上，CB 浓度等于或小于 1μg/ml

不会影响 PB1 的排出, 但是当 CB 浓度大于等于 $2.0\mu\text{g/ml}$ 时卵母细胞成熟率显著下降 (表 3-1)。即使高浓度 (7.5 和 $10.0\mu\text{g/ml}$) 的 CB 也不影响 GVBD 的发生。大部分卵母细胞发生了 GVBD 但停滞在 MI 期。这些结果提示, 牛和猪的卵母细胞对 CB 的敏感性是不同的, 并且是物种特异性的。

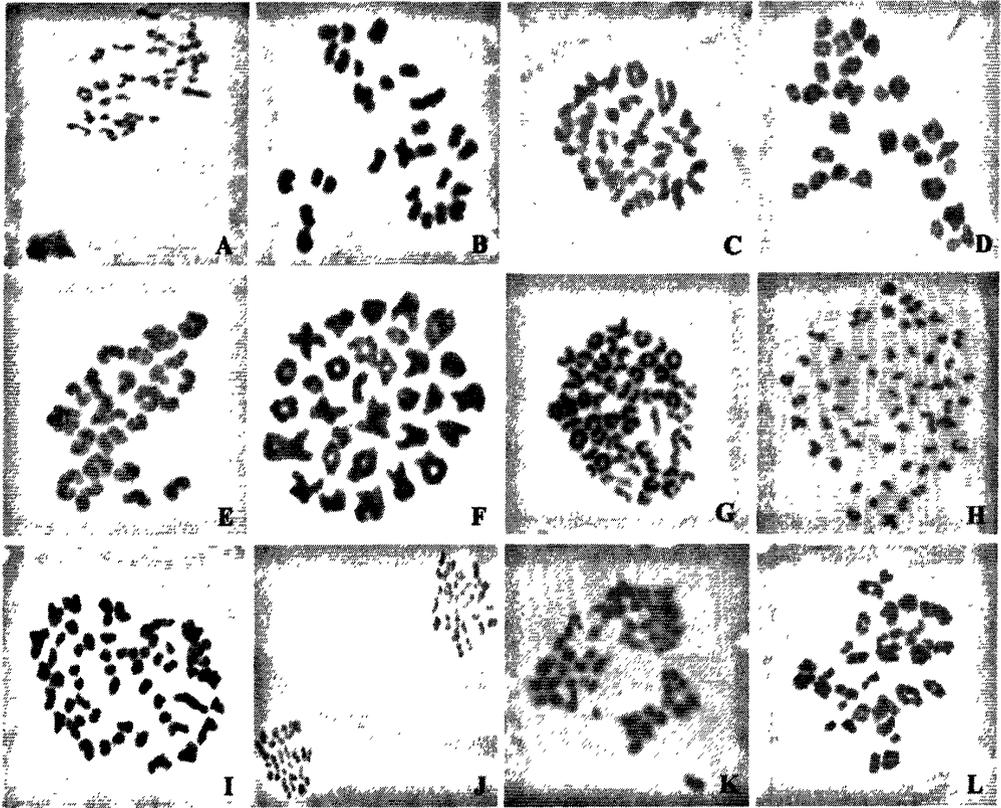


图 3-3 高浓度 CB 中长时间培养对牛卵母细胞染色体的影响

(A-D) 对照组; (E-L) CB 处理组。(A-C) MII 期; (D) 四分体; (E) MII 期; (F) 四分体; (G-H) 合并到一起的染色体, $2n=60$; (I-J) 两组 30 条染色体; (K) 染色体分离异常; (L) 同源染色体分离不完全。1000 \times

Fig.3-3 Chromosomal state of bovine oocytes after prolonged incubation with high concentration of CB.

(A-D) control; (E-L): CB treatment. (A-C) M II chromosome; (D) tetraploid; (E) M II chromosome; (F) tetraploid; (G-H) the merged chromosomes, $2n=60$; (I-J) two 30-chromosomes; (K) abnormal chromosome segregation; (L) incomplete segregation of homologous chromosomes. 1000 \times

我们对牛卵母细胞的研究显示, CB 浓度在 $1.0\mu\text{g/ml}$ 或低于该浓度时不影响卵母细胞的染色体单倍性。当 CB 浓度增加到 $2.0\mu\text{g/ml}$, 不仅使成熟率降低, 还导致染色体单倍性显著降低。我们的数据表明, $2.0\mu\text{g/ml}$ 或高于该浓度的 CB 引起同源染色体不均等分离, 从而导致染色体数目的不平均。长时间的 CB 处理也引起染色体数目的变化, 这可能导致

PB 排出过程中异常的同源染色体分离,使得最终卵母细胞中染色体分布的不规则。对 CB 处理后未排出 PB1 的卵母细胞分析发现,50%以上的卵母细胞含有 60 条(4c)染色体,有的是一组 60 条染色体,有的是两组每组 30 条染色体(图 3-1E-L;表 3-2)。

在成熟培养的前期用 CB 处理不超过 8h 时不影响卵母细胞成熟。CB 前期处理时间延长到 10h 就会降低成熟率,只有一半卵母细胞排出 PB1。CB 处理对卵母细胞成熟的影响是不可逆的。对前中期 I 或中期 I 的卵母细胞用 CB 进行进一步处理时,即使是较低浓度的 1.0 μ g/ml 也能引起极体排出率的显著降低。大部分卵母细胞没有排出 PB1,说明与早期(如 GV 期)的卵母细胞相比,成熟过程后期的卵母细胞对 CB 更敏感。对没有 PB1 卵母细胞进行染色体分析发现,这些卵中大多数含有 60 条或 120 条染色体(2n=60 或 4c=120)。免疫染色结果也显示,CB 诱导两组后期染色体形成两个纺锤体。然后两个纺锤体相互靠近融合形成一个大的纺锤体,这导致二倍染色体数卵母细胞的形成,该结果通过将卵母细胞在 CB 中延长处理时间进一步证明。这些结果表明,用含 CB 的培养液不论是前期处理、后期处理或整个成熟过程处理,均抑制 PB1 排出,导致 2n=60 或 4c=120 卵母细胞的形成。CB 处理的猪卵母细胞^[8]和尼古丁处理的牛卵母细胞^[9]也出现类似的现象。出现这种想象机制还需要进一步研究。

参考文献:

- [1] Welch MD, Mallavarapu A., Rosenblatt J., et al. Actin dynamics in vitro. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1997, 9: 54-61.
- [2] Wang W.H., Abeydeera L.R., Prather R.S., et al. Polymerization of nonfilamentous actin into microfilaments is an important process for porcine oocyte maturation and early embryo development. *Biol. Reprod.* 2000, 62: 1177-1183.
- [3] Sun QY, and Schatten H. Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization. *Reproduction* 2006, 131: 193-205.
- [4] Li GP, Liu Y, Bunch TD, et al. Asymmetric division of spindle microtubules and microfilaments during bovine meiosis from metaphase I to metaphase III. *Mol. Reprod. Dev.* 2005, 71: 220-226.
- [5] Wassarman PM, Josefowicz WJ, and Letourneau GE. Meiotic maturation of mouse oocytes in vitro: inhibition of maturation at specific stages of nuclear progression. *J. Cell Sci.* 1976, 22: 531-545.
- [6] Kubiak J, Paldi A, Weber M, et al. Genetically identical parthenogenetic mouse embryos produced by inhibition of the first meiotic cleavage with cytochalasin D. *Development* 1991, 111: 763-769.
- [7] Zhu ZY, Chen DY, Li JS, et al. Rotation of meiotic spindle is controlled by microfilaments in mouse oocytes. *Biol. Reprod.* 2003, 68: 943-946.
- [8] Somfai T, Ozawa M, Noguchi J, et al. Diploid porcine parthenotes produced by inhibition of first polar body extrusion during in vitro maturation of follicular oocytes. *Reproduction* 2006, 132: 559-570.

-
- [9] Liu Y, Li GP, White KL, et al. Nicotine alters bovine oocyte meiosis and affects subsequent embryonic development. *Mol. Reprod. Dev.* 2007, 74: 1473–1482.
- [10] Maro B, Johnson MH, Pickering SJ, et al. Changes in actin distribution during fertilization of the mouse egg. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1984, 81: 211–237.
- [11] DiMaggio AJ, Jr Lonergan TA, and Stewart-Savage J. Cortical granule exocytosis in hamster eggs requires microfilaments. *Mol. Reprod. Dev.* 1997, 47: 334–340.
- [12] Connors SA, Kanatsu-Shinohara M, Schultz RM, et al. Involvement of the cytoskeleton in the movement of cortical granules during oocyte maturation, and cortical granule anchoring in mouse eggs. *Dev. Biol.* 1998, 200: 103–115.
- [13] Schatten G, Schatten H, Spector I, et al. Latrunculin inhibits the microfilament-mediated processes during fertilization, cleavage and early development in sea urchins and mice. *Exp. Cell Res.* 1986, 166: 191–208.

第四章 用细胞松弛素 B (CB) 处理卵母细胞对

四倍体孤雌胚胎发育的影响

前言

四倍体胚胎是研究多倍体细胞植入后发育的重要模型^[1]。在四倍体胚胎与二倍体胚胎的嵌合体中,四倍体胚胎只参与胚外组织的生成^[2-4]。在 $4n/2n$ 嵌合胚胎中,四倍体细胞并不和二倍体细胞一起参与 ICM (inner cell mass) 的构建,而是更倾向分布于滋养外胚层^[5-7]。嵌合胚胎附植后,二倍体细胞参与胚体和胚外组织的构建,四倍体细胞只参与胚外组织的构建,随着妊娠期的延长,胎儿组织中四倍体成分越来越少^[7-9]。因此用胚胎干细胞 (ES) 和 $4n$ 细胞聚合形成嵌合体后获得完全由 ES 细胞来源的研究中,四倍体细胞是非常有优势的^[2,11,12]。在最近的研究中,四倍体囊胚成功的作为中间受体用以获得存活的小鼠 IPS 细胞来源的后代^[13,14]。四倍体补偿技术绕过了嵌合体小鼠阶段,可以直接获得 IPS 小鼠,大大地节约了成本、缩短了研究周期。此外,通过将四倍体胚胎与克隆胚胎或克隆胚胎内细胞团聚合,使小鼠出生率分别提高了 2.6 倍和 6 倍^[15],因此四倍体胚胎是研究克隆机理的重要工具。

四倍体胚胎作为一种研究机体发育的有力工具,自发出现的概率很低,因此必须人为制作大量的四倍体胚胎以作研究之用。四倍体胚胎在小鼠、兔、猪和牛中可以由抑制胚胎早期卵裂^[16]、卵裂球融合^[17-19]、或电融合^[20-23]来获得。二倍体卵母细胞的形成使得获得孤雌四倍体胚胎成为可能。本研究通过抑制 PB1 和 PB2 的排出来获得四倍体胚胎。在正常的体外成熟过程中 PB 是能够排出的。在用不同浓度的细胞松弛素 B 处理牛卵母细胞后,获得二倍体卵母细胞,对这些卵母细胞进行孤雌激活后对胚胎的发育和细胞学组成进行了研究。

1.1 材料与amp;方法

1.3 材料

材料及牛卵母细胞培养液同第一章材料。

1.4 方法

1.4.1 牛卵母细胞的体外成熟

方法同第一章。根据实验需要在成熟液中添加 CB。

1.4.2 卵母细胞的孤雌激活

成熟培养后,对有PB1和无PB1卵母细胞分别进行激活。激活方法为:5 μ M的离子霉素处理5min,然后用含有10 μ g/ml的CHX和5 μ g/ml CB的CR1aa(添加3%FBS)在39 $^{\circ}$ C、5% CO₂条件下处理5h。CB添加到CHX中的目的是抑制PB1和PB2排出以及产生四倍体胚胎。激活后,卵母细胞在30 μ l的CR1aa+BSA中发育培养40h。卵裂卵转移到牛卵丘细胞单层饲养层上培养至7天,培养液为CR1aa+FBS,培养条件为39 $^{\circ}$ C、5% CO₂。

1.4.3 染色体分析和细胞数统计

1-细胞、2-细胞胚胎和第七天的囊胚用于分析染色体组成和胚胎细胞中核的数目。1-细胞、2-细胞胚胎在0.05 μ g/ml的秋水仙胺(Gibco)中处理20h,囊胚在0.05 μ g/ml的秋水仙胺中处理5h。然后将胚胎在1%柠檬酸钠中低渗处理10-15min,转移到干净载玻片上固定,充分晾干。晾干的玻片用1%吉姆萨染色10min。染色体在1000 \times 油镜下(Nikon 80i)观察,确定每个囊胚的染色体组成,拍照。那些由于染色体过度分散或堆积成团而不能明显辨别的胚胎没有做分类。在进行染色体观察的同时进行细胞计数。

1.4.4 实验设计

- (1) 在成熟液中添加0.1、0.2、0.5、1.0、3.0、5.0、7.5和10.0 μ g/ml的CB处理牛卵母细胞24h后,对有PB1和无PB1的卵母细胞分别进行孤雌激活,并对发育情况进行分析。
- (2) 卵母细胞用含7.5和15 μ g/ml CB的成熟液分别预处理6、8、10h。然后彻底清洗卵母细胞,并用正常成熟液继续培养到25h。检查极体排出情况,排出PB1卵母细胞进行孤雌激活并发育培养,观察发育情况。
- (3) COC首先在正常成熟液中培养10h,然后将它们转移到含有1.0、3.0、5.0和7.5 μ g/ml CB的培养液中培养至24h。有PB1和无PB1卵分别进行孤雌激活并发育培养,观察发育情况。

对上述孤雌激活发育培养的囊胚、未卵裂卵、发育停滞的2-细胞胚胎等进行染色体制片以分析其核的状态等。

1.4.5 数据分析

体外发育实验每组重复三次以上。各组的囊胚细胞数用单因素方差分析(ANOVA)进行比较;各组的囊胚发育率和染色体组成用t-检验的方法进行比较。

2. 结果

2.1 牛卵母细胞用 CB 处理 24h 对激活后胚胎发育的影响

用 CB 处理卵母细胞 24h 后, 对排出和未排出 PB1 的卵母细胞分别进行孤雌激活。在 PB1 排出组中, 对照组和 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 处理组囊胚率分别为 15.1%和 14.9%, 显著高于 0.5 和 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 处理组的 6.9%和 5.0%(表 4-1)。平均囊胚细胞数随着 CB 处理浓度的增加而减少(表 4-2)。没有排出 PB1 的卵母细胞也能够发育到囊胚阶段(表 4-1)。

对囊胚进行染色体分析显示, 来自有 PB1 卵的囊胚有 50-60%是二倍体的, 并且随着 CB 浓度的增加二倍体/四倍体混合倍体囊胚数增加。来自无 PB1 卵的囊胚 75%以上是四倍体的, 尤其是当 CB 浓度达到 7.5 $\mu\text{g/ml}$ 时, 所有囊胚都是四倍体的 (表 4-2)。

表4-1 不同浓度CB处理卵母细胞孤雌激活后的发育

Table 4-1 Parthenogenetic development of oocytes matured in different concentrations of Cytochalasin B

CB ($\mu\text{g/ml}$)	激活卵数 No. activated	卵裂率 Cleavage (%)	囊胚率 Blastocyst (%)
有 PB1 卵母细胞 (Oocytes with PB1)			
对照 Control	99	76(76.8) ^a	15(15.1) ^a
0.1	121	97(80.2) ^a	18(14.9) ^a
0.5	102	80(78.4) ^a	7(6.9) ^b
1.0	99	65(65.7) ^{ab}	5(5.0) ^b
无 PB1 卵母细胞 (Oocytes without PB1)			
3.0	88	58(65.9) ^{ab}	8(9.1) ^b
5.0	87	60(69.0) ^{ab}	8(9.2) ^b
7.5	91	46(50.5) ^c	5(5.5) ^b
10.0	104	37(35.6) ^c	0

同一列中不同的上标数值表示有显著性差异。a, b 和 b, c: $P < 0.05$; a, c: $P < 0.01$.

Values with different superscripts within the same column differ significantly. a, b and b, c: $P < 0.05$; a, c: $P < 0.01$.

表4-2 不同浓度CB处理卵母细胞孤雌激活后囊胚染色体组成

Table 4-2 Chromosomal composition of parthenogenetic blastocysts derived from oocytes incubated in CB-containing medium for 24 h

CB ($\mu\text{g/ml}$)	囊胚						细胞数
	总数 Total	2n	2n/3n/	2n/4n	2n/3n/4n	4n	Cell number
有 PB1 卵母细胞 Oocytes with PB1							
对照 Control	13	8(61.5) ^a	1(7.7) ^a	2(15.4) ^a	0	2(15.4) ^a	68.6 \pm 12.1 ^a
0.1	18	11(61.1) ^a	1(5.5) ^a	2(11.1) ^a	1(5.5)	3(16.7) ^a	71.0 \pm 10.3 ^a
0.5	7	4(57.1) ^a	0	2(28.6) ^{ab}	0	1(14.3) ^a	45.8 \pm 5.8 ^b
1.0	4	2(50) ^a	0	2(50) ^b	0	0	32.8 \pm 9.1 ^b
无 PB1 卵母细胞 Oocytes without PB1							
3.0	8	0	0	2(25) ^{ab}	0	6(75) ^b	45.1 \pm 4.7 ^b
5.0	8	0	0	1(16.7) ^a	0	7(87.5) ^b	43.0 \pm 1.3 ^b
7.5	5	0	0	0	0	5(100) ^b	39.7 \pm 3.9 ^b

同一列中不同的上标数值表示有显著性差异。a, b 和 b, c: $P < 0.05$; a, c: $P < 0.01$.

Values with different superscripts within the same column differ significantly. a, b and b, c: $P < 0.05$; a, c: $P < 0.01$.

2.2 用 CB 预处理卵母细胞对后期胚胎发育的影响

第三章的结果显示, 用 $7.5\mu\text{g/ml}$ 和 $15\mu\text{g/ml}$ 的 CB 预处理卵母细胞 6h、8h、10h 时, 随着处理时间的延长, 成熟率明显下降。对预处理后排出 PB1 的卵进行孤雌激活的结果显示 (表 4-3), 6h 处理组和对照组的卵裂率、囊胚发育率和囊胚细胞数没有显著差异。处理 8h 的卵母细胞孤雌激活后 $15\mu\text{g/ml}$ 处理组的囊胚率为 7.9%, 显著低于 $7.5\mu\text{g/ml}$ 处理组的 15.7% 和对照组的 15.6%。处理 10h 引起胚胎发育率和囊胚细胞数的显著降低 (表 4-3)。说明 CB 以时间依赖的方式影响胚胎发育。

2.3 用 CB 后处理卵母细胞对胚胎发育的影响

卵母细胞在成熟培养的后 14h 用 CB 处理, 将排出 PB1 和没有排出 PB1 的卵母细胞分别进行孤雌激活, 结果显示, 各处理组的卵裂率 (68.8-84.5%) 与对照组 (79.8%) 无显著性差异。但是 CB 处理组的囊胚发育率 (24.8-27.7%) 却显著高于对照组 (15.3%) (表 4-4)。说明成熟培养后期用 CB 处理提高胚胎发育率。

表 4-3 用 CB 前期处理卵母细胞对接下来孤雌胚胎发育的影响

Table 4-3 Effect of pretreatment of oocytes with CB on subsequent parthenogenetic embryo development

CB ($\mu\text{g/ml}$)	总数 Total	卵裂率 Cleavage (%)	囊胚率 Blastocyst (%)	囊胚细胞数 Blastocyst cell no.
CB 中处理 6h 后在正常成熟液中继续培养到 24h				
IVM in CB for 6hr then in NMM to 24hr				
7.5 μg	105	80(76.2) ^a	14(13.3) ^a	79.5 \pm 18.2 ^a
15.0 μg	93	73(78.5) ^a	13(14.0) ^a	71.1 \pm 16.3 ^a
CB 中处理 8h 后在正常成熟液中继续培养到 24h				
IVM in CB for 8hr then in NMM to 24 hr				
7.5 μg	127	80(62.9) ^b	20(15.7) ^a	75.8 \pm 14.6 ^a
15.0 μg	101	50(49.5) ^c	8(7.9) ^b	58.4 \pm 12.7 ^b
CB 中处理 10h 后在正常成熟液中继续培养到 24h				
IVM in CB for 10 hr then in NMM to 24 hr				
7.5 μg	80	41(51.3) ^c	6(7.5) ^b	45.9 \pm 10.2 ^b
15.0 μg	87	39(44.8) ^c	6(6.9) ^b	34.2 \pm 9.3 ^b
正常成熟液中培养 24h (对照)				
IVM in NMM for 24 hr (control)				
Control	96	73(76.0) ^a	15(15.6) ^a	71.6 \pm 10.6 ^a

同一列中不同的上标数值表示有显著性差异。a, b 和 b, c: P<0.05; a, c: P<0.01.

Values with different superscripts within the same column differ significantly. a, b and b, c: P<0.05; a, c: P<0.01.

表 4-4 CB 后处理卵母细胞对孤雌胚胎发育的影响

Table 4-4 Parthenogenetic development of oocytes posttreated with CB

CB ($\mu\text{g/ml}$)	PB1	激活卵数 No. activated	卵裂率(%) Cleavage (%)	囊胚率(%) Blastocyst(%)
1.0	+	234	188(80.3) ^a	62(26.5) ^a
3.0	+	161	136(84.5) ^a	40(24.8) ^a
3.0	-	234	188(80.0) ^a	65(27.8) ^a
5.0	+	125	86(68.8) ^a	31(24.8) ^a
5.0	-	274	197(71.9) ^a	76(27.7) ^a
7.5	-	286	210(73.4) ^a	73(25.5) ^a
Control	+	228	182(79.8) ^a	35(15.3) ^b

卵母细胞用离子霉素和CHX+CB激活。同一列中不同的上标数值表示有显著性差异。a, b: P<0.05.

The oocytes were activated by ionomycin and CHX+CB. Values with different superscripts within the same column differ significantly. a, b: P<0.05.

对所得囊胚进行染色体分析显示, CB处理组和对照组中排出PB1卵来源的囊胚有53.3-60.9%是二倍体的, 各组间囊胚细胞数没有显著性差异。而用3.0、5.0和7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CB处理后未排PB1卵来源的囊胚中, 分别有73%、75%和76%是四倍体 ($4n=120$), 所有胚胎都不是二倍体(表4-5), 并且所有的囊胚细胞数显著低于对照组囊胚和排出PB1卵来源的囊胚(表4-5)。

表 4-5 由 CB 后处理卵母细胞来源的囊胚染色体组成

Table 4-5 Chromosomal composition of blastocysts derived from oocytes post-treated with CB

组别 Group	检测胚胎 数 Embryos examined	囊胚染色体组成(%) Chromosomal composition of blastocysts (%)						囊胚细胞数 Blastocyst cell no.
		2n	4n	2n/3n	2n/4n	4n/8n	其他* Other*	
1.0, pb+	45	24(53.3)	2(4.4) ^b	1(2.2)	16(35.6)	0	2(4.4)	67.3±11.2 ^a
3.0, pb+	30	17(56.6)	3(10) ^b	0	7(23.3)	0	3(10)	64.1±9.2 ^a
3.0, pb-	49	0	36(73.4) ^a	0	4(8.2)	4(8.2)	5(10.2)	53.2±10.7 ^b
5.0, pb+	23	14(60.9)	1(4.3) ^b	1(4.3)	4(17.4)	0	3(13.0)	62.1±16.7 ^a
5.0, pb-	56	0	42(75.0) ^a	3(5.4)	5(8.9)	3(5.3)	3(5.3)	44.7±20.1 ^b
7.5, pb-	67	0	51(76.1) ^a	0	6(8.9)	5(7.5)	5(7.5)	43.4±17.8 ^b
Control	68	39(57.3)	7(10.3) ^b	7(10.3)	15(22.0)	0	0	66.9±14.7 ^a

*分别包括 $3n+4n$ 、 $2n+3n+4n$ 、 $3n+4n+6n$ 和 $4n+6n+8n$ 胚胎。pb+: 排PB1的卵母细胞; pb-: 未排PB1的卵母细胞。同一列中不同的上标数值表示有显著性差异 ($P<0.05$)。

*Including $3n+4n$, $2n+3n+4n$, and $4n+6n+8n$ embryos, respectively. pbt: oocytes with PB1; pb-: non-PB1 oocytes. Values with different superscripts within the same column differ significantly ($p<0.05$).

为了了解囊胚中 $4n$ 染色体的来源, 本实验分析了后处理卵母细胞来源的早期胚胎, 即1-细胞、2-细胞胚胎的染色体组成。结果显示, 74% (31/42) 的1-细胞胚胎染色体是 $4n=120$ 条, 12% (5/42) 是 $2n=60$ 条。82% (95/116) 的2-细胞胚胎卵裂球是 $4n=120$, 约3%的胚胎是 $2n+4n$ 嵌合的。

表4-1、4-3和4-4显示, 很大比例的CB处理卵母细胞不卵裂, 在激活处理40h后停滞在1-细胞阶段。在对照组中, 80%的未卵裂胚胎停滞在1个原核或2个原核阶段。而CB处理后停滞在1-细胞的胚胎有50-60%有1个原核、2个原核、3-6个原核, 7-11%的胚胎停在 $4n$ 中期(表4-6), 约15%的1-细胞胚胎含有多倍(多于 $4n$)染色体, 甚至无法进行染色体计数(图4-1 D-F)。

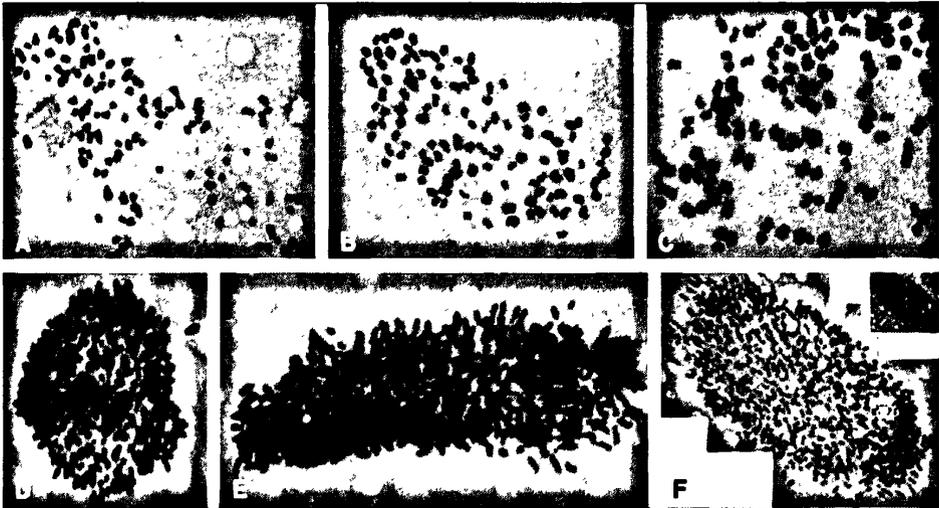


图4-1 囊胚染色体组成。(A-C) $4n=120$; (D-F) 停滞在1-细胞期的未卵裂胚胎中的多倍染色体。1000 \times

Fig 4-1 Chromosomal compositions of the blastocysts. (A-C) $4n=120$; (D-F) Multiple chromosomes in a single cells in uncleaved stopped one-cell embryos. 1000 \times

3. 讨论

本研究的目的是评价CB处理卵母细胞的发育能力。卵母细胞用CB前期处理、后期处理或24h处理，然后有PB1卵和无PB1卵分别进行孤雌激活。结果显示，与前期处理组和对照组卵母细胞相比，后期处理组无论是有PB1组还是无PB1组，囊胚率都很高（25-28%）。这说明，用CB对卵母细胞进行后期处理能够改善胚胎发育率。出现这种现象的机制还不太清楚，需要进一步的研究。染色体分析显示，CB处理后未排PB1的卵母细胞来源的囊胚是四倍体的。四倍体胚胎的形成无疑是由没排PB1和PB2的卵母细胞来的。对处于前中期I或中期I的卵母细胞用CB处理时，抑制PB1的排出并导致二倍体卵母细胞的形成（ $2n$ ，或 $4c=60$ ）。在进行孤雌激活时，CHX液中添加CB进一步抑制PB2排出，形成四倍体胚胎。本研究结果显示， $2n$ 或 $4c$ 的卵母细胞具有较高的四倍体胚胎发育率，这为获得四倍体牛胚胎提供了实用的途径。我们还观察到，除了个别卵裂球含原核外，几乎所有的1-细胞胚胎和2-细胞胚胎卵裂球都是四倍体的（表4-5）。这表明 $4n$ 的核早在1-细胞和2-细胞阶段就形成了，然后 $4n$ 的核维持到囊胚阶段。

在CB处理组中，很大部分卵母细胞不卵裂，在激活处理后40h时停滞在1-细胞阶段。通常的实验会把这些未卵裂的1-细胞胚胎弃掉，从而在这些激活后未卵裂胚胎中发生的事件无从知晓。我们收集了未卵裂胚胎并进行了染色体分析。在对照组中，80%以上的胚胎停滞在1个原核或两个原核阶段。但是在CB处理后未卵裂胚胎中，出现了各种各样的核相，

表4-6 CB处理后卵母细胞孤雌激活并发育培养40h后未卵裂的1-细胞胚胎的染色体分析

Table 4-6 Analysis of the uncleaved one-cell stopped embryos after the CB-treated oocytes were parthenogenetic activated and incubated for 40h

处理 Treats	分析胚胎 数 No.	Nuclear status of the uncleaved 1-cell stopped embryos 停滞在1-细胞期未卵裂胚胎的核状态							≥3n总数 Totalo of ≥3n	其他* Others*
		1 PN	2 PN	1PN+2PN总数 Total of IPN+2PN		3-6 PN	2n	4n		
卵母细胞在CB中培养24h (Oocytes incubated in CB for 24 h)										
3.0	30	7(23.3) ^{ab}	6(20) ^b	13 (43.3) ^b	5(16.7)	0	4(13.3)	1(3.3)	10 (33.3) ^b	7(23.3)
5.0	27	4(14.8) ^b	7(25.9) ^b	11 (40.7) ^b	4(14.8)	0	2(7.4)	4(14.8)	10 (37.0) ^b	6(22.2)
7.5	45	6(13.3) ^b	8(17.8) ^b	14 (31.1) ^c	11(24.4)	0	5(11.1)	7(15.6)	23 (51.1) ^a	8(17.8)
10.0	60	7(11.7) ^b	9(15) ^b	16 (26.7) ^c	16(26.7)	0	6(10)	10(16.7)	32 (53.4) ^a	12(20)
卵母细胞在开始成熟培养时在CB中预处理10h (Oocytes incubated in CB beginning at IVM 10 h)										
3.0	40	5(12.5) ^b	7(17.5) ^b	12 (30) ^c	10(25)	0	3(7.5)	6(15)	19 (47.5) ^a	9(22.5)
5.0	71	12(16.9) ^b	12(16.9) ^b	24 (33.8) ^c	15(21.1)	0	6(8.4)	12(16.9)	33 (46.5) ^a	14(19.7)
7.5	76	12(15.8) ^b	13(17.1) ^b	25 (32.9) ^c	14(18.4)	0	8(10.5)	12(15.8)	34 (44.7) ^a	17(22.3)
Control	21	8(38.0) ^a	9(42.8) ^a	17 (81.0) ^a	0	2(9.5)	0	0	2 (9.5) ^c	2(9.5)

*包括染色体片段化、退化和死的胚胎。同一列中不同的上标数值表示有显著性差异 (P<0.05)。

*Including chromatin fragmented, degenerated, and dead. Values with different superscripts within the same column differ significantly (p<0.05).

包括3-6个原核、 $4n$ 或多于 $4n$ 的中期相。让人惊奇的是超过15%的胚胎在一个细胞中含有超多染色体,有的至少达到 $18n$ 。如图4-1所示,细胞中的染色体难以计数。在40h内细胞DNA复制很多倍是难以置信的。为什么会出现这种现象目前为止仍是个谜。但是在发育中的胚胎和囊胚中没观察到超高数目的染色体,这说明卵裂的卵裂球失去了快速复制DNA的能力。可能有复杂的生化和生理学机制参与了我们在这些胚胎中所观察到的现象,这些机制需要进一步研究。

以上结果表明,CB作为微丝组装的抑制剂影响牛卵母细胞的成熟。CB前期处理和后期处理卵母细胞诱导形成二倍体($2n$ 或 $4c$)卵母细胞。二倍体卵母细胞有很高的四倍体胚胎发育率,这可能成为获得四倍体胚胎的有效途径。约有15%的未卵裂1-细胞胚胎含有超多染色体。

参考文献:

- [1] Kaufman MH, Webb S. Postimplantation development of tetraploid mouse embryos produced by electrofusion. *Development* 1990, 110: 1121-1132.
- [2] Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, et al. *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003: 359-398.
- [3] Eakin GS, Behringer RR. Tetraploid development in the mouse. *Developmental Dynamics*, 2003, 228:751-766.
- [4] James RM, Klerkx AH, Keighren M, et al. Restricted distribution of tetraploid cells in mouse tetraploid-diploid chimaeras. *Developmental Biology*, 1995, 167:213-226.
- [5] Everett CA, West JD. The influence of ploidy on the distribution of cells in chimaeric mouse blastocysts. *Zygote* 1996, 4: 59-66.
- [6] Everett CA, West JD. Evidence for selection against tetraploid cells in tetraploid/diploid mouse chimaeras before the late blastocyst stage. *Genet. Res.* 1998, 72: 225-228.
- [7] Everett CA, Stark MH, West JD, et al. Three-dimensional reconstruction of tetraploid/diploid chimaeric mouse blastocysts. *J. Anat.* 2000, 196: 341-346.
- [8] Tang PC, West JD. The effects of embryo stage and cell number on the composition of mouse aggregation chimaeras. *Zygote* 2000, 8: 235-243.
- [9] James RM, Klerkx AH, Keighren M, et al. Restricted distribution of tetraploid cells in mouse tetraploid-diploid chimaeras. *Dev Biol* 1995, 167: 213-226.
- [10] Wang ZQ, Kiefer F, Urbanek P, et al. Generation of completely embryonic stem cell-derived mutant mice using tetraploid blastocyst injection. *Mech. Dev.* 1997, 62: 137-145.
- [11] Ueda O, Jishage K, Kamada N, et al. Production of mice entirely derived from embryonic stem (ES) cell with many passages by coculture of ES cells with cytochalasin B induced tetraploid embryos. *Exp. Anim.* 1995, 44: 205-210.

- [12] Wang ZQ, Kiefer F, Urbánek P, et al. Generation of completely embryonic stem cell-derived mutant mice using tetraploid blastocyst injection. *Mech. Dev.* 1997, 62: 137–145.
- [13] Zhao XY, Li W, Lv Z, et al. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature* 2009, 461: 86–90.
- [14] Kang L, Wang J, Zhang Y, et al. iPS cells can support full-term development of tetraploid blastocyst-complemented embryos. *Cell Stem Cell.* 2009, 5: 135–138.
- [15] Jiangwei Lin, Linyu Shi, Man Zhang, et al. Defects in Trophoblast Cell Lineage Account for the Impaired In Vivo Development of Cloned Embryos Generated by Somatic Nuclear Transfer. *Cell Stem Cell*, 2011, 8: 371–375
- [16] Snow MH. Tetraploid mouse embryos produced by cytochalasin B during cleavage. *Nature* 1973, 244: 513–515.
- [17] Eglitis MA. Formation of tetraploid mouse blastocysts following blastomere fusion with polyethylene glycol. *J. Exp. Zool.* 1980, 213: 309–313.
- [18] Spindle A. Polyethylene glycol-induced fusion of two-cell mouse embryo blastomeres. *Exp Cell Res.* 1981, 131: 465–470.
- [19] O'Neill GT, Speirs S, Kaufman MH. Sex-chromosome constitution of postimplantation tetraploid mouse embryos. *Cytogenet. Cell Genet.* 1990, 53: 191–195.
- [20] Ozil JP, Modlinski JA. Effects of electric field on fusion rate and survival of 2-cell rabbit embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1986, 96: 211–228.
- [21] Iwasaki S, Kono T, Fukatsu H, et al. Production of bovine tetraploid embryos by electrofusion and their developmental capability in vitro. *Gamete Res.* 1989, 24: 261–267.
- [22] Curnow EC, Gunn IM, Trounson AO. Electrofusion of two-cell bovine embryos for the production of tetraploid blastocysts in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 2000, 56: 372–377.
- [23] Li GP, Cai Sh, Xu L, Sun X, Liu Z, Tan J. Studies on the early development of mouse tetraploid embryos produced by electrofusion. *Develop Reprod Biol* 1998, 7:17-23.

第五章 卵母细胞核的存在对克隆胚胎供体核重编程和 多倍体胚胎发育的影响

前言

体细胞核移植是一个应用于实验室和家畜动物上的相对完善但效率较低的技术程序^[1-3]。在正常的克隆胚胎发育过程中,供体细胞核(核)和受体细胞胞质(质)之间细胞周期的相互协调是非常重要的^[4,5]。为了获得与细胞供体遗传上相同的拷贝,把受体卵母细胞的核 DNA 去除,称为“去核”。去核过程通常是把成熟卵母细胞的 MII 纺锤体和其周围的少量胞质一同去除,这是核移植的关键步骤之一。

对于核移植来说, MII 期卵母细胞比 MI 期或 GV 期卵母细胞更适合作为胞质受体^[3,6]。 MII 期卵母细胞含有高水平的活性成熟促进因子 MPF 和 MAPK, 它们诱导核膜破裂 (NEBD)、早熟染色体凝集 (PCC)、核仁分散, 这些事件可能对于核重编程都是很关键的^[5,7]。在各种动物上的研究显示, 不同物种、不同细胞类型、不同激活程序和不同卵龄的卵, 供体核 PCC 的发生和发生程度都不同^[8-10]。在小鼠中, PCC 对于移入核重编程是非常关键的^[1]。在大鼠中, 供体细胞融合入卵母细胞后引起形态各异的 PCC, 这受到大鼠品系和卵龄的影响^[11]。在羊上, 与去核卵母细胞相比, 未去核卵母细胞引起更多供体核发生 NEBD^[5]。在牛上, PCC 不是胚胎发育必需的, 细胞核注入胞质直接引起 PCC 的发生^[12]。我们过去的研究结果显示, 融合后到激活之间时间的延长引起不正常的纺锤体形态, 纺锤体结构异常的胚胎发育能力差^[13]。但是, 卵母细胞核的存在是否影响、如果影响的话是如何影响移入核发生 PCC 还是未知的。

克隆过程中的不完全去核, 即遗传物质的残留, 会导致异倍体的发生, 并对接下来的发育和受体胞质的遗传干扰发生不利影响^[14]。将体细胞移植到去核或未去核卵母细胞中使体细胞单倍体化称为半克隆 (semi-cloning)^[15], 这种方法用于获得人工配子。Lacham-Kaplan^[16]等将二倍体细胞注射入未去核小鼠卵母细胞中获得人工合子, 但是几乎没有得到囊胚。人们对小鼠^[17-19]、大鼠^[20]和中国仓鼠都用半克隆方法进行了人工卵母细胞或合子的发育潜能研究^[17]。将次级精母细胞核注射到卵母细胞中后, 卵母细胞和精母细胞的染色体都完成第二次减数分裂, 从而形成合子, 发育成正常的可育后代^[21]。但是以上有关半克隆的报道

显示, 染色体正常的比率很低(<15%), 人工获得的卵母细胞或合子显示出严重的染色体或纺锤体异常, 以及很差的体外发育能力。杨辉等人^[22]以未去核卵母细胞为胞质受体制备核移植胚胎的研究表明, 完整的小鼠卵母细胞能够有效的将体细胞进行重编程, 并且在不去核的情况下得到多倍体胚胎, 能够分离得到 4n 的 ES 细胞。

本研究以未去核的未去核卵母细胞为胞质受体构建重构胚胎, 分析了卵母细胞核和供体细胞核在相同胞质中的动态行为, 以及卵母细胞核的存在对胚胎发育和染色体组成的影响。

1. 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器设备

显微操作仪 (Narishige, N88NEN2), 拉针仪 (Narishige, PN-30), 磨针仪 (Narishige, EG-400), 融合仪 (澳大利亚, Cryologic, Voltain EP1 Cell fusion system), 立式光学显微镜 (Nikon, SMZ1500), CO₂ 培养箱 (立康, HF90), 超净工作台 (泰斯特), 离心机。

1.1.2 试剂及耗材

DMEM/F12 培养基为 Gibco 产品, 无机盐类及 D-PBS-为日本和光试剂, 胰蛋白酶, 离子霉素(Inomycin), 放线菌酮 (CHX), Hoechst33342 为 SIGMA 公司产品, 标准胎牛血清为 TBD 产品, 其余试剂为国产分析纯, 四孔培养板, 24 孔培养板为 Nunc 产品, 其余玻璃器皿及耗材均为国产。

1.2 方法

1.2.1 卵母细胞体外成熟培养

牛卵母细胞的成熟方法同第一章。成熟培养 16h 后, 在 0.1%透明质酸酶中震荡去除卵丘细胞, 然后继续在成熟液中培养至 20h。在两步成熟过程之后, 由于 16h 去卵丘时第一极体还没有完全排出, 因此到 20h 时排出的第一极体与卵母细胞 MII 纺锤体挨近而未发生位置迁移。因此, PB1 被用于鉴别卵母细胞染色体位置, 通过该方法鉴别卵母细胞核能使去核率达到 90%^[6]。

1.2.2 供体细胞培养

卵丘细胞培养: 成熟培养 24h 的卵母细胞用 0.1%透明质酸酶消化卵丘细胞, 用

DMEM/F12 (1:1)洗涤卵丘细胞三次,在添加 10%FBS 的 DMEM/F12 中 37°C、5%CO₂ 条件下培养。

成纤维细胞培养:从 3 岁龄奶牛耳部活体剪组织,用添加 2%FBS 和抗生素的 PBS 溶液彻底洗涤。然后将组织剪碎,用添加 15% FBS 和抗生素的 DMEM/ F12 (1:1)悬起,接种到 60mm 培养皿中进行组织块培养,培养条件为 37°C、5% CO₂,培养 7-10 天。卵丘细胞和成纤维细胞汇合度达到 80%时进行传代。在进行核移植之前胰蛋白酶消化,10-12 μ m 大小的细胞作为核供体。

1.2.3 核移植

卵母细胞进行去核操作时,以不含钙镁的 PBS 中添加 3mg/ml 不含脂肪酸的 BSA 和 5.0 μ g/ml CB 为操作液。去核时,将 PB1 连同紧邻的含卵母细胞遗传物质的胞质去除。去核与否通过用 Hoechst 33342 染色并紫外照射观察核来确定。单个供体细胞移植到受体胞质的卵周隙中。

不去核组中,将卵母细胞 PB1 调整至 3 点钟的位置,显微操作时去除 PB1 并将供体核移入 4 点钟(近核区)或 8:30(远离核区)位置的卵周隙内。

1.2.4 融合和激活

融合参数为 1.2 kV/cm 电击 25 μ sec,融合液为 0.27M 的甘露醇添加 0.1mM CaCl₂、0.1 mM MgCl₂ 和 0.05% BSA。融合后的重构胚在从卵母细胞开始成熟算起 24 到 25h 之间进行激活,激活方法为首先 5 μ M 离子霉素(ionomycin)处理 5min,接下来放线菌酮(cycloheximide, CHX)处理 5h。

1.2.5 胚胎培养

激活后的胚胎在 30 μ l 添加 0.3% BSA 的 CR1aa 发育液中发育培养 40h。然后将卵裂的胚胎转移到以牛卵丘细胞为饲养层的共培养滴中,此时的发育液为 30 μ l 添加 3% FBS 的 CR1aa,继续培养 5 天,每 48h 换液一次,培养条件为 39°C、5% CO₂。分别在开始发育培养后的 48h 和 7d 进行卵裂率和囊胚发育率的统计。

1.2.6 体外培养过程中核的变化

融合以后的核首先膨胀,然后发生核膜破裂(NEBD)。此后,细胞染色质凝集成可见的、离散的染色体样结构即 PCC。用未去核卵制备重构胚后进行激活,第二极体变圆变平滑。孤雌激活后,供体核和卵母细胞核形成原核。

1.2.7 染色体分析及胚胎细胞计数

第七天的囊胚在 0.05 $\mu\text{g/ml}$ 的秋水仙胺 (colcemid, Gibco) 中孵育 5h, 然后用 0.8% 的柠檬酸钠处理 10-15min, 再将单个胚胎转移到载玻片上, 固定并用吉姆萨染色。染色体在 1000 \times 油镜下观察, 以确定每个囊胚的染色体组成。根据染色体组成成分如下几类: 二倍体 ($2n=60$)、四倍体 ($4n=120$)、混合倍体 (如 $2n/3n$, $2n/4n$, $2n/3n/4n$, $2n/4n/6n$ 和 $2n/4n/8n$)。对那些染色体呈弥散状或堆积成团的胚胎不进行分类计数。显微镜观察的同时进行了细胞计数。

1.2.8 微管的免疫荧光染色

微管的免疫荧光染色方法同第一章。

1.3 实验设计:

实验一: 分析了供体核移植到去核或未去核卵母细胞中后供体细胞核的动态变化。将供体核移植到远离卵母细胞 MII 纺锤体的位置。融合后的重构卵在 CR1aa 中培养 0.5、1、2、3、4、5、6 h 和 20h, 然后进行固定并进行微管和染色体的免疫荧光染色。

实验二: 将供体细胞移植到靠近或远离未去核卵母细胞 MII 纺锤体的位置, 分析供体细胞和卵母细胞核的动态变化。

实验三: 研究了激活后供体细胞核在未去核卵母细胞胞质中的动态变化。重构卵用离子霉素和 CHX 进行激活。激活的卵培养 0.5、1、2、3、4、5、6 h 和 20 h 后进行固定和免疫荧光染色。

实验四: 研究了供体细胞移植到未去核卵母细胞中构建胚胎的发育情况。融合后的重构胚胎在 CR1aa 中发育培养 7 天, 统计了卵裂率、囊胚发育率、分析了囊胚的染色体组成。

实验五: 通过反向核移植 (reverse nuclear transfer, RNT) 的方法研究了卵母细胞核的存在对克隆胚胎发育的影响。操作时, 卵母细胞的极体定位在 6 点或 12 点位置, 然后把供体细胞注入 3 点位置。电刺激诱导细胞融合。融合后的 1h (RNT-1h) 或 3h (RNT-3h) 对供体细胞成功融合的卵母细胞进行去核操作, 去核卵用 Hoechst 染色并用紫外照射来验证去核率。去核卵在培养箱中恢复培养 30min, 然后用离子霉素和 CHX 激活。得到的胚胎进一步发育培养; 部分胚胎在开始激活后的 2、4 和 6h 进行固定, 对微管和 DNA 进行染色。对 RNT 克隆囊胚的染色体组成也进行了分析。

1.4 数据分析

每组的发育培养数据来自四次或更多次的重复实验。卡方检验用于确定卵裂率和囊胚发育率的显著性差异。 $p < 0.05$ 时认为具有显著性差异。

2. 结果

2.1 未去核卵母细胞中供体细胞 PCC 发生情况

在去核组, 融合后1.5h时, 大部分供体细胞发生NEBD并进入前中期阶段, 染色体周围出现小的微管星体 (图5-1A 和 B); 融合后2h, 供体细胞发生PCC并形成典型的M期纺锤体 (图5-1C); 融合3h之后, 纺锤体伸长或分成几部分。

在未去核组, 供体核在融合后的30min即发生PCC并形成M期样纺锤体 (图5-1D); 融合后1h, 卵母细胞的MII纺锤体和供体的M期纺锤体共存于胞质中(图5-1E和F); 融合后2h以上, 供体细胞纺锤体变形 (图5-1G 和 H), 并且分成几个部分 (图5-1I)。因此, 与去核卵母细胞相比, 未去核卵母细胞中更容易发生供体细胞的PCC。

融合后20h, 74.4% (90/121) 的未去核卵母细胞的核进入MIII。供体细胞核显示出多种结构模式, 如M期 (49.6%) 结构、1-4个长的纺锤体片段 (18.2%) 结构、原核 (PN) (6.6%) 以及弥散状染色体 (8.3%) (表5-1)。在10.7% (13/121) 的重构卵母细胞中, 卵的M期染色体和供体核的M期染色体相互靠近并混合在一起(图5-1J-L)。卵母细胞的核均没有形成PN, 供体细胞也只有6.6%形成PN。

表5-1 未去核卵母细胞与供体细胞融合后20h的核状态

Table 5-1. Nuclear state at 20 h after the fusion of nonenucleated oocytes with donor cells

卵母细胞核状态	供体细胞核状态	胚胎数 (%)
MIII	M期	60 (49.6)
MIII	1-4个长的纺锤体	22 (18.2)
MIII	原核 (PN)	8 (6.6)
染色体弥散	染色体弥散	10 (8.3)
后期II/末期II	M期或长纺锤体	8 (6.6)
混合形成一个大的纺锤体		13 (10.7)
合计		121

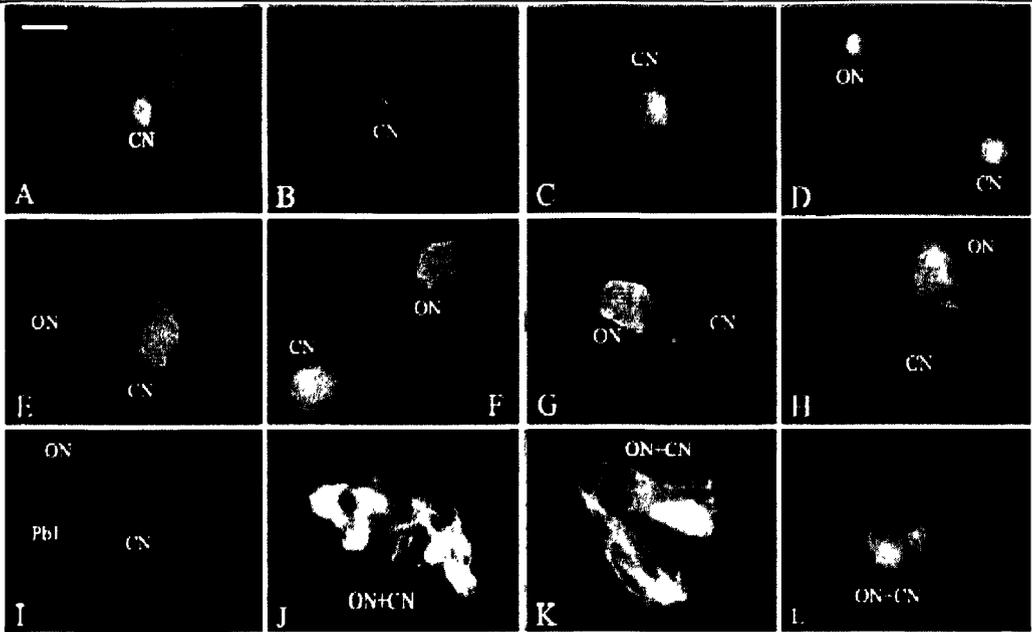


图5-1 用去核和未去核卵母细胞构建的克隆胚胎的核状态。(A-C) 去核核移植；(A-B) 融合后1-1.5h，细胞核处于前中期阶段；(C) 融合后2h，供体细胞形成典型的中期纺锤体。(D-L) 未去核核移植；(D) 融合后30min，供体细胞形成中期样纺锤体；(E, F) 融合后1h，卵母细胞MII纺锤体和供体中期M纺锤体并存。(G, H) 融合后4-6h，供体细胞纺锤体变的不规则。(I) 融合后4-6h，供体细胞纺锤体分成几个片段。(J-L) 融合后20h，卵母细胞和供体细胞的M期染色体相关联并混合在一起。ON：卵母细胞核；CN：供体细胞核。(所有图片630×)

Fig. 5-1. Nuclear state of the enucleated or unenucleated cloned embryos. (A-C) enucleated nuclear transfer; (A-B) 1-1.5 h after fusion, cell nuclei were at premetaphase state; (C) 2.0 h after fusion, donor cell formed typical M-phase spindle. (D-L) Unenucleated nuclear transfer; (D) 30 min after fusion donor cell formed metaphase-like spindle; (E, F) One hour after fusion, oocyte MII spindle and the donor M-phase spindle coexisted. (G, H) Four to 6 h after fusion, donor cell spindles became disfigured. (I) Donor cell spindle separated into several pieces after fusion for 4 to 6 h. (J-L) After fusion for 20 h, donor cell nuclei oocyte M-phase and donor cell M-phase chromosomes connected or merged together. ON: oocyte nucleus; CN: cell nucleus. Bar, 50 mm. (all images 630×).

2.2 供体细胞的融合位置对卵母细胞PB2排出的影响

供体细胞的融合位置影响卵母细胞PB2的排出。当把供体细胞植入远离卵母细胞MII纺锤体的位置时，94.4% (85/90) 的重构卵排出PB2。当融合位置靠近MII纺锤体时，几乎没有NT卵排出PB2，MII纺锤体和供体细胞M期纺锤体互相靠近并混合在一起形成一个大的纺锤体。在去核对照组，5.2% (4/77) 的重构卵排出PB2。在孤雌激活对照组，93.8% (61/65) 的MII卵母细胞在激活后排出PB2 (图5-2)。

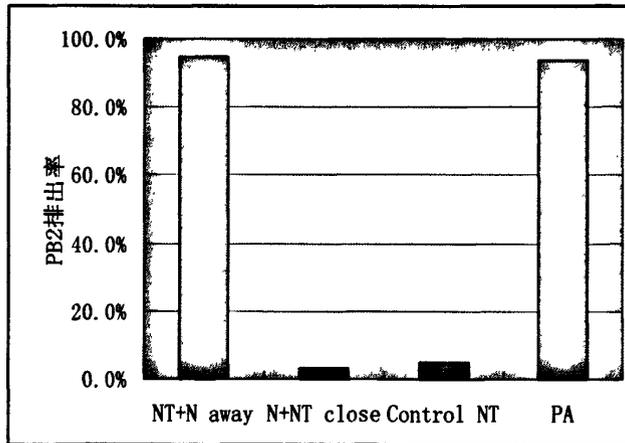


图 5-2 供体细胞的融合位置对卵母细胞 PB2 排出的影响。NT+N away: 供体细胞融合位置远离未去核卵母细胞 MII 纺锤体; NT+N close: 供体细胞融合位置靠近未去核卵母细胞 MII 纺锤体; Control NT: 去核核移植; PA: 孤雌激活。

Fig.5-2. Fusion position of donor cell affected oocyte PB2 extrusion. NT+N away: unenucleated NT the donor cell far away from oocyte MII spindle; NT+N close: nonenucleated NT the donor cell fusing close to MII spindle; Control NT: enucleated nuclear transfer; PA: parthenogenetic activation.

2.3 重构克隆胚胎激活后供体核和卵母细胞核的原核发育

重构胚胎经离子霉素 5min+CHX 5h 激活处理后, 81%的移入体细胞核形成一个原核。同时, 67%的卵母细胞核形成略小于供体核的原核(图 5-3A), 另外有 25%的卵母细胞核处于末期 II 阶段。

体外培养 20h 后, 52.6%的克隆胚胎中存在来自卵母细胞核和移入供体核的原核(图 5-3B); 有 6.6%的胚胎中两个来源的原核相关联(图 5-3C, D); 在 9.2%的胚胎中, 两个原核融合形成一个大的原核(图 5-3E); 约有 13%的胚胎中核发育不同步, 卵和供体细胞的核或者处于原核阶段或者处于中期阶段; 另外, 有 14.5%的胚胎核发育不规则, 出现如几团染色质(图 5-3F, G)、卵母细胞核分裂(图 5-3H)、染色体弥散(图 5-3I)以及两个末期纺锤体(图 5-3J)等现象(表 5-2)。供体核和卵母细胞核混合在一起的胚胎进入第一次有丝分裂, 而未混合在一起的染色体团形成原核样结构(图 5-3K)。

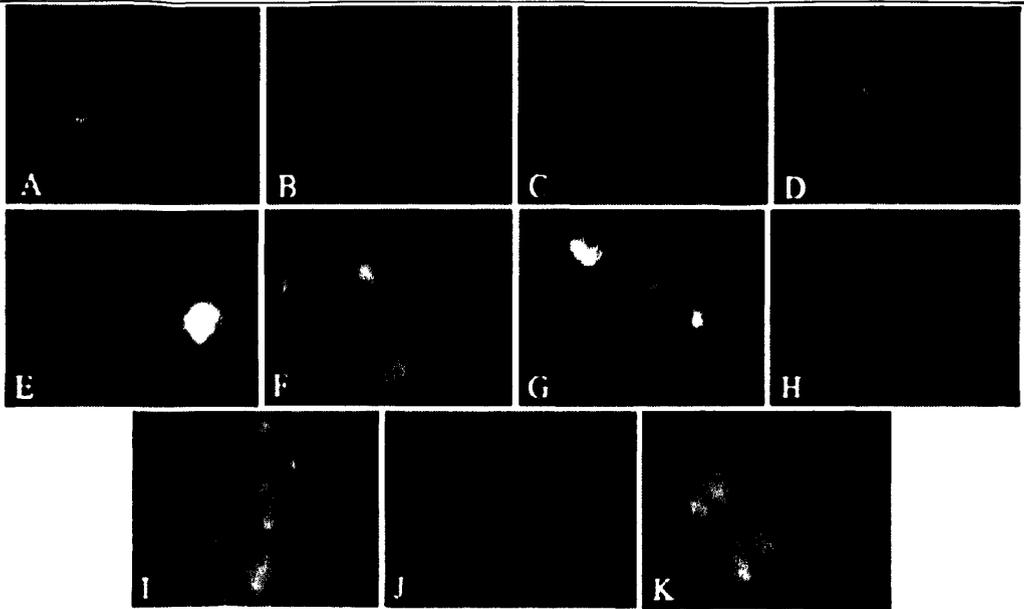


图 5-3 以未去核卵母细胞构建的重构克隆胚胎激活后供体核和卵母细胞核的原核发育。(A) CHX 激活 5h 后供体细胞核形成一个大的原核, 卵母细胞核形成小的原核; (B) 分别由卵母细胞和供体细胞来源的两个原核; (C, D) 由卵母细胞和供体细胞来源的两个原核相连接; (E) 由卵母细胞和供体细胞来源的两个原核融合形成一个大的原核; (F-J) 核的不规则发育; (K) 第一次有丝分裂, 核周围有几小团染色质形成原核样结构。630×

Fig. 5-3 Development of unenucleated reconstructed oocytes after activation. (A) Cell nucleus formed a large PN, while the oocyte nucleus formed a small PN 5 h after CHX treatment. (B) Two nuclei formed from oocyte and donor. (C, D) Two PNs derived from donor and oocyte connected. (E) A large PN formed after fusion of donor cell and oocyte nuclei. (F-J) Irregular nuclear development. (K) First mitosis, noted several small masses of chromatin formed PN-like structures. 630×.

表 5-2 以未去核卵母细胞制备的克隆胚胎激活后 20h 卵母细胞核和供体细胞核的状态

Table 5-2. Oocyte and donor cell nucleus state of the nonenucleated clones 20 h after parthenogenetic activation treatment

卵子的核 Oocyte nuclei	供体细胞核 Cell nuclei	特点 Characteristics	克隆胚胎数 No. of clones (%)
PN+2Pb	PN		40 (52.6)
PN+2Pb	PN	两个原核相关联	5 (6.6)
卵子和供体细胞的核融合 成一个大的原核			7 (9.2)
PN+2Pb	1-3 个长纺锤体		3 (3.9)
PN+2Pb	中期	充满微管	4 (5.3)
MIII+Pb	PN		3 (3.9)
MIII+2PB	中期		3 (3.9)
不规则	不规则	形成多个小染色质团	11 (14.5)
总数			76

2.4 用未去核卵母细胞构建的克隆胚胎的发育

以未去核卵母细胞构建胚胎后, 分析 2-、3-、4-和 6-细胞阶段的胚胎发现, 约 60%的卵裂球是单核, 有 40%是双核, 还有几个卵裂球没有 DNA。在去核卵母细胞构建的胚胎中, 2-6 细胞阶段胚胎 94%的卵裂球是单核的(图 5-4)。

重构胚经过发育培养后, 以卵丘细胞为核供体时卵裂率和囊胚发育率分别为 81.9%和 22.3%, 与去核对照组的 84.9%和 29.1%没有显著差异 ($p>0.05$); 以成纤维细胞为核供体时卵裂率和囊胚发育率分别为 90.3%和 22.7%, 与对照组的 81.9%和 31.1%也没有显著差异 ($p>0.05$); 而囊胚孵化率则以卵丘细胞为供体时 0, 以成纤维细胞为供体时 27.5%, 分别低于去核对照组的 23.1% ($p<0.05$) 和 72.3% ($p<0.05$) (表 5-3)。



图 5-4 由未去核卵构建的早期胚胎的细胞核。A: 2-细胞胚胎, B: 4-细胞胚胎, C: 14-细胞胚胎

Fig. 5-4 Cell nuclear of early stage embryos constructed by nonenucleated oocytes. A: two-cell stage embryos, B: 4-cell stage embryos, C: 14-cell stage embryos.

表 5-3 以未去核卵和去核卵构建的重构胚胎的体外发育

Table 5-3. In vitro development of the cloned embryos reconstituted with nonenucleated versus with enucleated oocytes

供体细胞 Donor cells	操作方法 Protocol	重构卵数 No.	卵裂率 Cleavage (%)	桑葚胚率 Morula (%)	囊胚率 Blastocyst (%)	孵化率 Hatched (%)
牛卵丘细胞 Bovine cumulus	N+NT	188	154 (81.9)	53 (28.2)	42 (22.3)	0 ^a
牛卵丘细胞 Bovine cumulus	NT	179	152 (84.9)	63 (35.2)	52 (29.1)	12 (23.1) ^b
牛成纤维细胞 Bovine fibroblast	N+NT	176	159 (90.3)	45 (25.6)	40 (22.7)	11(27.5) ^b
牛成纤维细胞 Bovine fibroblast	NT	177	145 (81.9)	65 (36.7)	55 (31.1)	40(72.3) ^c

NT: 普通的去核核移植; NT+N: 以未去核卵母细胞为胞质受体进行核移植。同一列中, a,b; b,c; a,c: $p<0.05$.

NT, normal enucleation nuclear transfer; N+NT, unenucleation nuclear transfer. At the same column, a,b; b,c; a,c: $p<0.05$.

2.5 由未去核卵为胞质受体克隆得到囊胚的染色体组成

染色体制片结果显示, 在去核对照组和未去核组克隆囊胚中, 可辨认的有丝分裂染色体相平均为 15% 和 10%。在去核组中, 以卵丘细胞和成纤维细胞为核供体得到的囊胚分别有 75% 和 82% 是二倍体的。在未去核组, 无论以卵丘细胞还是以成纤维细胞为核供体, 得到的囊胚细胞数 (约 60 个细胞) 明显少于去核对照组的囊胚细胞数 (约 90 个细胞) (图 5-5 A-B), 并且所有克隆囊胚都是混合倍性的, 例如 $2n/3n$ 、 $2n/4n$ 、 $2n/6n$ 、 $2n/8n$ 、 $4n/6n$ 、 $4n/8n$ 、 $1n/2n/4n$ 、 $2n/3n/4n$ 和 $2n/4n/8n$ 等 (图 5-5 C-F), 发生频率比较高的是 $2n/4n$ 、 $2n/8n$ 、 $4n/8n$ 、 $2n/4n/6n$ 和 $2n/4n/8n$ 混合体 (表 5-4)。

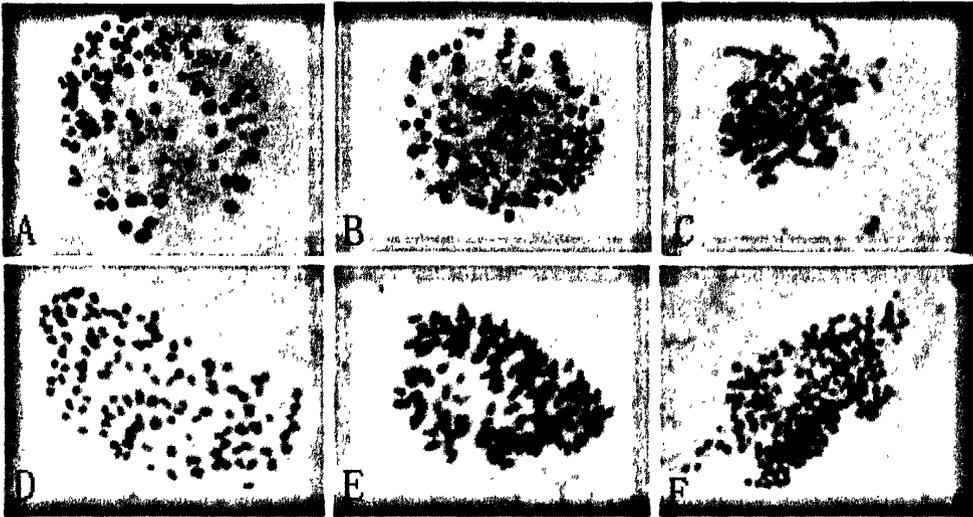


图 5-5 未去核卵为胞质受体克隆得到囊胚的细胞数和染色体组成 A,B: 囊胚的细胞数; C: 囊胚中 $2n$ 染色体; D: 囊胚中 $3n$ 染色体; E: 囊胚中 $4n$ 染色体; F: 囊胚中 $6n$ 染色体

Fig. 5-5 Cell number and chromosomal composition of cloned blastocysts derived from nonenucleated oocytes. A,B: Cell number of resulted blastocysts; C: $2n$ chromosomes; D: $3n$ chromosomes; E: $4n$ chromosomes; F: $6n$ chromosomes

2.6 反向核移植 (RNT) 重构胚中体细胞核的染色体结构

在 RNT 实验中, 在所操作的 357 个卵中, 大部分卵母细胞 (70.9%) 与转入的细胞融合, 有 0.6% 的卵母细胞仅与极体融合, 4.2% 的卵母细胞与极体和供体细胞均融合; 15.7% 的卵未发生融合, 另有 8.7% 的卵溶解退化 (图 5-6)。

融合后 1h 进行卵母细胞去核 (RNT-1h) 时, 65% 卵母细胞的核染色体没有发生分散, 在开始激活后 6h 内发生 DNA 解聚膨松化、展开并组装成一个原核样结构。当卵母细胞和体细胞相互作用时间延长到 3h, 即融合后 3h 去核 (RNT-3h) 时, 核染色体呈互相分离状态, 与 RNT-1h 组相比, 看上去更加不规则。该组中多数体细胞核不能在激活后 6h 形成原核样结构 (图 5-7)。

表5-4 以未去核卵母细胞构建的克隆胚胎的染色体组成和囊胚细胞数

Table 5-4. chromosomal composition and cell Number of the nonenucleated cloned blastocysts

组别 Groups	囊胚染色体组成 Blastocyst chromosomal composition (%)													细胞数 No. cells	
	分析胚胎 Embryos analyzed														
	2n	4n	2n/3n	2n/4n	2n/6n	2n/8n	4n/6n	4n/8n	1n/2n/4n	2n/3n/4n	2n/4n/6n	2n/4n/8n			
BCC, NT	24(75)	2(6.3)	0	6(18.8)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	89.9±31.2 ^a
BCC, NT+N	0	0	2(6.7)	5(16.7)	1(3.3)	3(10)	1(3.3)	2(6.7)	2(6.7)	4(13.3)	4(13.3)	6(20)	6(20)	6(20)	58.9±33.4 ^b
BFC, NT	36(81.8)	1(2.3)	0	5(11.4)	0	0	0	0	0	2(4.5)	0	0	0	0	91.7±40.1 ^a
BFC, NT+N	0	0	2(4.3)	4(8.5)	2(4.3)	7(14.9)	3(6.4)	12(25.5)	0	3(6.4)	5(10.6)	9(19.1)	9(19.1)	9(19.1)	62.1±24.9 ^b

BCC: 牛卵丘细胞; BFC: 牛成纤维细胞; NT: 普通的去核移植; NT+N: 以未去核卵母细胞为胞质受体进行核移植。同一列中, a, b: $p < 0.05$ 。

BCC, bovine cumulus cells; BFC, bovine fibroblast cells; NT, normal nuclear transfer; NT+N, nuclear transfer with presence of oocyte nuclei. At the same column, a, b: $p < 0.05$.

2.7 RNT克隆胚胎的发育

RNT 胚胎发育培养结果显示, RNT-1h 和 RNT-3h 两组的卵裂率分别为 67.4% 和 70.8%, 没有显著差异。但是 RNT-1h 组囊胚发育率远远高于 RNT-3h 组 (47.2 vs. 20%, $p < 0.01$)。两组的囊胚孵化率相近, 没有显著差异 (92.9 vs. 83.8%, $p > 0.05$)。两组囊胚二倍体细胞比率没有显著差异 (81.2 vs. 80.6%, $p > 0.05$) (表 5-5)。

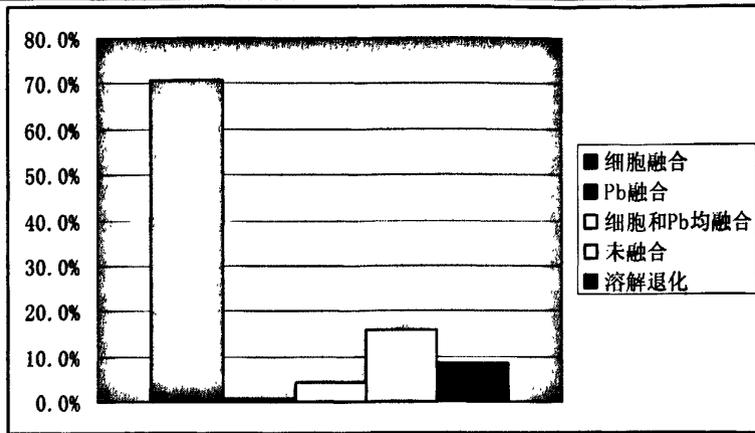


图5-6 将体细胞注射到有极体的卵母细胞卵周隙中之后卵母细胞和体细胞的融合情况

Fig. 5-6 Fusion results of oocyte-cell pairs reconstituted by inserting somatic cells into perivitelline space of oocytes with polar bodies.

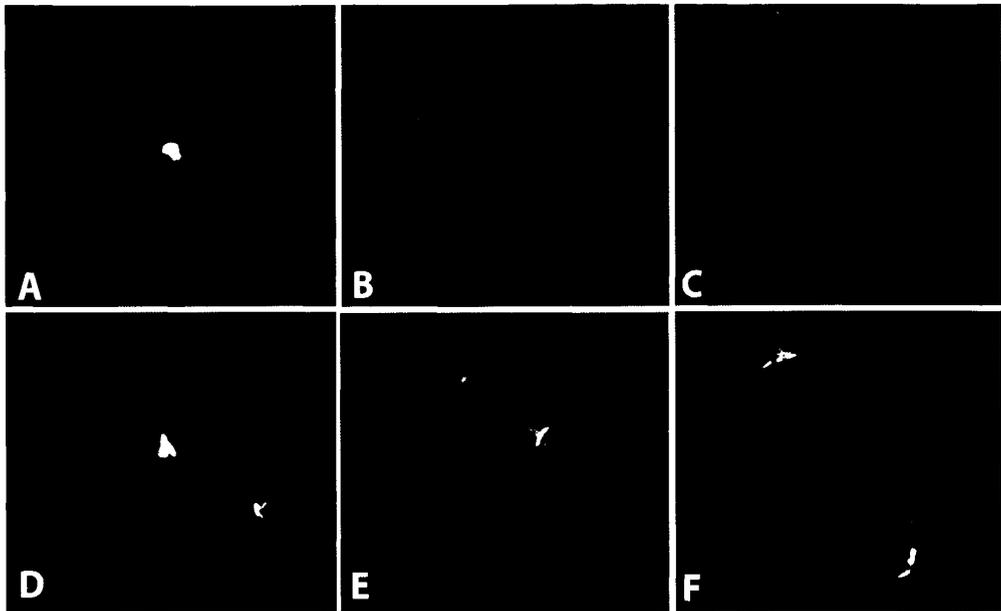


图 5-7 RNT-1h 组(A-C)和 RNT-3h 组(D-F)的胚胎在开始激活处理 2-6h 后体细胞核的状态。在 RNT-1h 组中, 激活后 2h 时染色体 DNA 开始膨大 (A); 然后 DNA 膨大展开并开始形成原核样结构, 其中部分 DNA 还没有展开 (B); 更多的 DNA 展开形成原核样结构 (C)。在 RNT-3h 组, 激活 2h (D)、4h (E) 和 6h (F) 后 DNA 处于不规则的无组织状态, 在培养过程中这种形态几乎不发生变化。

Fig. 5-7 Somatic cell nucleus status of cloned embryos produced by RNT-1h (A-C) and RNT-3h (D-F) protocols at 2-6 h postonset of activation treatment. In the RNT-1h group, DNA pieces became swollen 2 h postonset of activation (A); DNA pieces deployed and began to form a pronucleus-like structure; some DNA pieces still remained undeployed (B); more DNA pieces deployed and formed a pronucleus-like structure (C). In the RNT-3h group, DNA pieces remained more unorganized at 2 (D), 4 (E), and 6 h (F) postonset of activation; this morphology changed little during this period of culture.

表5-5 反向核移植克隆胚胎的体外发育

Table 5-5. In vitro development of reverse nuclear transfer cloned embryos

NT 方法 NT Protocol	胚胎数 No.	卵裂率 Cleavage (%)	桑葚胚率 Morula (%)	囊胚率 Blastocyst (%)	孵化率 Hatched (%)	二倍体细胞比率 Proportion of diploid cells (%)
RNT-1h	89	60 (67.4)	49 (55.1) ^a	42 (47.2) ^a	39 (92.9)	81.2
RNT-3h	120	85 (70.8)	31 (36.5) ^b	24 (20) ^b	20 (83.3)	80.6

同一列中, a,b: $p < 0.05$ 。

At the same column, a,b: $p < 0.05$.

3. 讨论

脊椎动物卵母细胞中高活性的 MPF 影响染色体凝集以及减数分裂纺锤体的维持。其机制都与 MII 期减数分裂停滞相关。MPF 在细胞周期的 M 期位于染色质附近, 在 G2 期分散到胞质中。当 MPF 因 cyclinB 的降解而失活后, 卵母细胞突破 MII 期阻滞。高水平的 MPF 和 MAPK 会引起移植核发生 PCC 并与核重编程相关。在小鼠的克隆中, 供体核发生 PCC 是很关键的。在大鼠中, PCC 诱导潜能是由受体胞质的来源决定而不是由供体核的来源决定。这与牛不同, 牛的核重编程过程中 PCC 不是必需的。本研究结果显示, 融合和激活之间的时间间隔超过 3 个小时就会导致形成两个或多个染色体复合物, 最终引起 NT 胚胎中形成单个、两个或多个核结构^[13], 本研究也得到相似的结果。Tani 等^[12]认为, 牛体细胞核的重编程不是由 MPF 和 MAPK 活性直接调控的。

本研究结果表明, 卵母细胞 MII 染色体的存在很容易诱发供体细胞核发生 PCC。去核卵核移植胚胎发生 PCC 比未去核卵核移植胚胎晚至少 1h。由于 MPF 优先与染色体结合^[23,24], 因此卵母细胞染色体的存在可以保证高水平 MPF 的维持, 这可能与供体细胞的 PCC 有关。去核可能去除了大部分 MPF, 从而使得胞质中由高水平 MPF 发挥的功能较之完整卵母细胞降低^[5]。去核胞质中 MPF 水平的降低仍然能够诱导 PCC^[23], 但是对供体核的作用方式变慢。在羊上, 当体细胞与未去核卵母细胞融合时也发现类似的现象, 大多数核发生 PCC, 但是与去核卵融合时, 大部分供体核保持完整^[5]。

通常一个成熟卵母细胞只含有一套单倍染色体, 两套或更多套染色体可能导致受精后或核移植后形成多倍体, 并且导致早期胚胎死亡。在标准的核移植程序中, 为了维持核移植胚胎的二倍体组成, 要把二倍体体细胞移植到去核的卵母细胞中。在鼠中,

有人将体细胞注射到未去核卵母细胞中。结果可以引起卵母细胞排出两个PB2：一个来自卵母细胞染色体，另一个来自体细胞的染色体^[25]。而且发现供体核位于卵母细胞周边时能促进供体细胞来源极体的排出，而位于中心的供体纺锤体可导致形成三个卵裂球^[25]。在本实验中，用未去核牛卵母细胞为受体胞质，当体细胞植入位置远离卵母细胞MII纺锤体时，几乎所有卵母细胞都排出PB2。当体细胞融合位置紧挨着卵母细胞MII纺锤体时，两个核融合在一起，来自体细胞核与卵核的染色体共同形成一个巨大纺锤体，卵母细胞不能排出PB2。我们的结果提示，未去核卵母细胞融入体细胞的位置将影响胚胎染色体结构和胚胎的发育模式。

我们分析了供体细胞核注射到或融合到未去核卵母细胞中是否支持重构胚胎的发育。在小鼠中，将体细胞注射到未去核卵母细胞中构建的重构胚胎能得到很高的卵裂率（80-90%）和桑葚胚发育率（50%），但是囊胚发育能力非常有限^[16]。在牛上，我们的结果显示，用未去核卵母细胞和去核卵母细胞构建重构胚胎得到相近的卵裂率（82-90%）。但是未去核卵母细胞克隆的囊胚发育率却低于去核卵母细胞克隆的囊胚率。

所有来自未去核卵母细胞的克隆囊胚都是多倍体或混合倍体。对2-6-细胞的克隆胚胎进行分析发现，约有40%的胚胎卵裂球含有两个细胞核，并且有几个卵裂球没有核。过去有关克隆牛胚胎的染色体分析表明，约有80%的囊胚细胞是二倍体的^[26-29]。卵母细胞核和供体细胞的存在使最终得到的克隆囊胚产生各种二倍性。二倍体细胞核与二倍体（融合位置紧邻MII纺锤体）或单倍体（融合位置远离MII纺锤体）卵母细胞的融合常导致重构胚胎形成四倍体或三倍体。这样的3n或4n胚胎由各种倍性混合而成。当卵裂球的遗传互补被破坏的时候胚胎发育明显迟缓。有多倍体细胞的胚胎得到的囊胚细胞数明显比较少。形态上看起来质量差的囊胚一般细胞数少并且显示出高频率的染色体畸形^[28]。在小鼠上用未去核卵母细胞进行核移植的研究也表明，具有二倍体染色体的半克隆合子的比例是很低的（6%和12%）^[18,19]。Tateno等^[17]证明，半克隆胚胎中同源染色体的分离是随机的，并且达到正确染色体分离的可能性与染色体数目相关。因此，半克隆合子中正常染色体数目不一定能保证进一步的正常卵裂和囊胚细胞的正常染色体数目，并且牛（2n=60）的半克隆胚胎形成正常染色体数目细胞的可能性远低于小鼠（2n=40）。这可能解释了我们的数据中二倍体细胞数为什么低于已报道的小鼠胚胎。

为了研究卵母细胞核的存在对克隆胚胎发育的影响，我们进行了反向核移植，也就

是在体细胞和卵母细胞融合后的1h (RNT-1h) 和3h (RNT-3h) 对卵母细胞进行去核。在RNT-1h组, 重编程过程, 如PCC、核膨胀以及DNA分离等似乎都比常规的克隆胚更容易发生。原核样结构的形成甚至发生的更早, 在激活后4h即可发生。但是, 在RNT-3h组, 卵母细胞中体细胞核DNA分成多个碎片, 并且不能正常重新组装, 到激活后的6h依然呈这种形态。我们的体外发育数据与观察到的RNT克隆胚胎核DNA结构相一致。RNT-1h组的囊胚发育率明显高于RNT-3h组, 与常规核移植克隆接近。结果表明, 卵母细胞核的短时间存在能够促进供体细胞核的重编程, 而卵母细胞核的长时间存在诱导供体细胞核DNA结构异常并使进一步发育受到限制。有关小鼠RNT的研究表明, 通过注射方法进行细胞核移植后, 在30min到1h内去除卵母细胞核可以获得活的克隆动物, 并且效率与常规核移植克隆相似, 而细胞注射后3h去核得到的胚胎进行胚胎移植后没有得到孕鼠^[30]。

本研究结果表明, 由于去核不完全而导致的卵母细胞核的存在, 将引起有缺陷的重构胚的形成, 造成克隆胚胎遗传上受损。这就是为什么克隆操作过程中彻底的去核对于建立正常二倍体重构胚的重要性。

总之, 我们的结果显示, (1) 卵母细胞 MII 纺锤体能有效诱导供体细胞发生 PCC; (2) 卵母细胞的核染色体参与重构体细胞克隆胚胎的染色体组成; (3) 未去核的卵母细胞能够支持克隆胚胎发育到囊胚阶段; (4) 由未去核卵母细胞得到的克隆囊胚均为混合多倍体。

参考文献:

- [1] Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M, et al. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 1998, 394: 369–374.
- [2] Hill JR. Abnormal in utero development of cloned animals: implications for human cloning. *Differentiation* 2002, 69: 174–178.
- [3] Campbell KHS, Alberio R. Reprogramming the genome: role of the cell cycle. *Reproduction* 2003, Suppl. 61: 477–494.
- [4] Miyoshi K, Rzucidlo SJ, Pratt SL, et al. Improvements in cloning efficiencies may be possible by increasing uniformity in recipient oocytes and donor cells. *Biol. Reprod.* 2003, 68: 1079–1086.
- [5] Lee JH, Campbell KHS. Effects of enucleation and caffeine on maturation-promoting factor (MPF) and mitogenactivated protein kinase (MAPK) activities in ovine oocytes used as recipient cytoplasts for nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 2006, 74: 691–698.
- [6] Li GP, White KL, Bunch TD. Review of enucleation methods and procedures used in animal cloning: state of the art. *Cloning Stem Cells* 2004, 6: 5–13.

- [7] Collas P, Balise J, Robl JM. Influence of cell cycle stage of the donor nucleus on development of nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.* 1992, 46: 492–500.
- [8] Loi P, Ledda S, Fulka J, et al. Development of parthenogenetic and cloned ovine embryos: effect of activation protocols. *Biol. Reprod.* 1998, 58: 1177–1187.
- [9] Shin MR, Park SW, Shim H, et al. Nuclear and microtubule reorganization in nuclear-transferred bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 2002, 62: 74–82.
- [10] Simerly C, Dominko T, Navara C, et al. Molecular correlates of primate nuclear transfer failures. *Science* 2003, 300: 297.
- [11] Hirabayashi M, Kato M, Takeuchi A, et al. Factors affecting premature chromosome condensation of cumulus cell nuclei injected into rat oocytes. *J. Reprod. Dev.* 2003, 49: 121–126.
- [12] Tani T, Kato T, and Tsunoda Y. Reprogramming of bovine somatic cell nuclei is not directly regulated by maturation promoting factor or mitogen-activated protein kinase activity. *Biol. Reprod.* 2003, 69: 1890–1894.
- [13] Aston KI, Li GP, Hicks BA, et al. Effect of the time interval between fusion and activation on nuclear state and development in vitro and in vivo of bovine somatic cell nuclear transfer embryos. *Reproduction* 2006, 131: 45–51.
- [14] Dominko T, Chan A, Simerly C, et al. Dynamic imaging of the metaphase II spindle and maternal chromosomes in bovine oocytes: implications for enucleation efficiency verification, avoidance of parthenogenesis, and successful embryogenesis. *Biol. Reprod.* 2000, 62: 150–154.
- [15] Tesarik J. Reproductive semi-cloning respecting biparental origin: embryos from syngamy between a gamete and a haploidized somatic cell. *Hum. Reprod* 2002, 17: 1933–1937.
- [16] Lacham-Kaplan O, Trounson DRA. Fertilization of mouse oocytes using somatic cells as male germ cells. *Reprod. Biomed. Online* 2001, 3: 205–211.
- [17] Tateno H, Akutsu H, Kamiguchi Y, et al. Inability of mature oocytes to create functional haploid genomes from somatic cell nuclei. *Fertil. Steril.* 2003, 79: 216–218.
- [18] Chen S, Chang C, Lu C, et al. Microtubular spindle dynamics and chromosome complements from somatic cell nuclei haploidization in mature mouse oocytes and developmental potential of the derived embryos. *Hum. Reprod.* 2004, 19: 1181–1188.
- [19] Heindryckx B, Lierman S, Van der Elst J, et al. Chromosome number and development of artificial mouse oocytes and zygotes. *Hum. Reprod.* 2004, 19: 1189–1194.
- [20] Fujii W, Funahashi H. In vitro development of nonenucleated rat oocytes following microinjection of a cumulus nucleus and chemical activation. *Zygote* 2008, 16: 117–125.
- [21] Kimura Y, Yanagimachi R. Development of normal mice from oocytes injected with secondary spermatocyte nuclei. *Biol. Reprod.* 1995, 53: 855–862.
- [22] Hui Yang, Linyu Shi, Shenghua Zhang, Jiangwei Lin, Jing Jiang, Jinsong Li. High-efficiency somatic reprogramming induced by intact MII oocytes. *Cell Research*, 2010, 20: 1034–1042.
- [23] Fulka J J, First NL, Moor RM. Nuclear transplantation in mammals: remodeling of transplanted nuclei under the influence of maturation promoting factor. *Bioessays* 1996, 18: 835–840.
- [24] Sung LY, Shen PC, Jeong BS, et al. Premature chromosome condensation is not essential for nuclear

-
- reprogramming in bovine somatic cell nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 2007, 76: 232–240.
- [25] Fulka JJ, First NL, Pasqualino L, et al. Cloning by somatic cell nuclear transfer. *Bioessays* 1998, 20: 847–851.
- [26] Mohamed NMS, Takahashi Y. In vitro developmental potential of bovine nuclear transfer embryos derived from primary cultured cumulus cells. *J. Vet. Med. Sci.* 2000, 62: 339–342.
- [27] Li GP, Bunch TD, White RL, et al. Development, chromosomal composition, and cell allocation of bovine cloned blastocyst derived from chemically assisted enucleation and cultured in conditioned media. *Mol. Reprod. Dev.* 2004, 68: 189–197.
- [28] Li GP, White KL, Aston KI, et al. Conditioned medium increases the polyploid cell composition of bovine somatic cell nuclear-transferred blastocysts. *Reproduction* 2004, 127: 221–228.
- [29] Plusa B, Grabarek JB, Karasiewicz J, et al. Meiotic maternal chromosomes introduced to the late mouse zygote are recruited to later embryonic divisions. *Mol. Reprod. Dev.* 2005, 70: 429–437.
- [30] Wakayama S, Cibelli JB, Wakayama, T. Effect of timing of the removal of oocyte chromosomes before or after injection of somatic nucleus on development of nt embryos. *Cloning Stem Cells* 2003, 5: 181–189.

结 论

1. 牛和山羊卵母细胞的核成熟进程相似, 绵羊卵母细胞核成熟进程略慢于牛和山羊。三种动物细胞骨架和染色体呈现相似的动态变化过程。
2. 细胞松弛素 B (CB) 处理破坏微丝引起纺锤体结构异常, 抑制卵母细胞第一极体 (PB1) 的排出, 降低卵母细胞成熟率, 导致二倍染色体卵母细胞的形成。
3. 经 CB 处理的卵母细胞在被孤雌激活后, 能够引起高比率的四倍体胚胎形成。
4. 卵母细胞的 MII 纺锤体的存在, 能够容易诱发植入的供体细胞核发生早熟染色质凝集 (PCC)。
5. 以未去核的卵母细胞为胞质受体进行体细胞克隆时, 其克隆胚胎的发育能力比以去核卵形成的克隆胚发育能力差, 并且得到的所有囊胚都是多倍体。
6. 反向核移植 (RNT) 即先移核后去核克隆操作。RNT-1h 组的囊胚发育率明显高于 RNT-3h 组, 与常规核移植克隆相似。说明卵母细胞核的短时间存在能够促进供体细胞核的重编程; 而卵母细胞核的长时间存在可能诱导供体细胞核 DNA 的发生异常, 从而使胚胎发育受到限制。

致谢

怀着一份感恩而虔诚的心情，在我的博士学位论文完成的时候，写下了我的致谢。读博士的这几年，是我记忆中最深刻和刻骨铭心的阶段。这一路走来，无限感慨，其间我迷茫过、苦恼过、沮丧过、痛苦过，但总算等到了论文完稿的这一刻。由衷地感谢在这段岁月中给予我锤炼和鞭策，给予我关心和呵护，给予我支持和鼓励的所有老师、同学和朋友！

非常感谢恩师旭日干院士让我成为他的学生，旭老师多年的积淀为我们树立了严谨的科研理念、提供了优良的实验环境和实验条件。虽然由于工作的特殊性等原因老师不能更多的亲自指导论文细节，但是始终关注着我们的实验进展，在论文撰写的后期也在百忙中抽时间倾注大量心血做详细的审阅，老师的这种一丝不苟的态度不是我用感谢二字能够言喻的。我很遗憾自己不能成为一个优秀的学生，在读博期间跟老师没有更多的沟通，希望能够得到恩师的谅解。在学习期间，旭老师对我的生活和身体也给予了许多的关心，在此向老师致以崇高的敬意和衷心的感谢！

特别感谢李光鹏老师，在论文完成过程中李老师倾注了大量的心血。从论文总体设计、实验方案的选择与实施，到试验结果的分析、论文的中英文写作与发表等等无不凝聚着李老师的心血和关怀。跟随李老师四年，在这四年中李老师给了我很多机会在各个方面提高自己、锻炼自己，使我积累了无比宝贵的人生财富。在此深表谢意！

由于论文涉及动物种类较多、研究内容较多、工作量大，在试验过程中得到老师们和同学们大量的帮助。卵母细胞的收集、培养、处理等方面得到了其布日、雪莲、刘慧、康峰、董树华、焦泽华等同学的大力帮助与协助；体细胞克隆操作与克隆胚胎培养等方面得到了程磊、苏广华、郜宇、刘坤等的大力帮助；在免疫组化分析与染色体制作等方面得到了魏著英、银凤霞、胡晓明、刘欣的大力帮助与协助。第五章反向核移植操作与分析得到了美国犹他州立大学孟庆刚博士 (Dr. Qinggang Meng) 和吴侠博士的大力帮助。在英文论文撰写和修改过程中得到了美国犹他州立大学 Dr. Bunch, Dr. White, 犹他大学的 Dr. Aston, Dr. Huong 等人的大力帮助。在此，向他们表示衷心的感谢。研究组其他各位弟弟妹妹在这几年中，在试验准备、实验室日常管理等诸多方面提供了帮助与支持，我爱你们每一个人！

非常感谢动物中心各位师长和同事多年来的关心、关爱与支持。衷心感谢其他每一位给予我帮助和支持的老师和同学。

在此，我还要感谢我爱人王利刚几年来对我的宽容、理解和呵护，感谢他在生活上给予我的精心周到的照顾。感谢父母对我的养育和教育之恩，在他们年逾古稀的时候还为我担心，我深感不安。也感谢我的兄弟姐妹和亲戚朋友对我的关心和理解。

几年下来我的工作中有很多不尽人意之处，在今后的工作中我将尽全力去弥补、去完善。最后，祝我们动物中心取得更大的科研成就，祝旭老师身体健康，祝各位老师工作顺利，祝各位同学学业有成！

攻读学位期间发表的论文

1. Qinggang Meng*, Chunling Bai*, Ying Liu, Xia Wu, Thomas D. Bunch, and Guang-Peng Li. In Vitro Development and chromosomal configuration of bovine somatic cloned embryos with nonenucleated metaphase II oocytes. Cellular reprogramming. 2010, 12(4): 481-490
2. Bai C*, Liu H*, Liu Y, Wu X, Cheng L, Bou S, Li GP. Diploid oocyte formation and tetraploid embryo development induced by cytochalasin B in bovine. Cell Reprogram. 2011, 13(1):37-45.
3. Chunling Bai*, Cheberi*, Lei Cheng, Fengxia Yin, Dongsheng Wu, Xihe Li, Bou Shorgan, Guang-Peng Li. Effect of Jasplakinolide on the in vitro maturation of bovine oocytes, African Journal of Biotechnology. (已接收)
4. 其布日, 白春玲, 程磊, 旭日干, 李光鹏. 牛体外成熟卵母细胞染色体形态学研究, 中国牛业科学. 2009,335(4): 1-5.
5. 白春玲, 张立, 吴侠等. 内蒙古白绒山羊的体细胞克隆, 内蒙古大学学报. 2011, 42(2): 190-195.
6. 白春玲, 其布日, 李光鹏. 绵羊、山羊、牛卵母细胞成熟过程中细胞核和细胞骨架的动态学变化. 中国动物学会第十六届会员代表大会暨学术讨论会论文摘要汇编, 209, 重庆北碚, 2009年10月.
7. 白春玲, 张立, 吴侠等. 高品质绒山羊的体细胞克隆. 第十五次全国细胞与分子显微技术学术研讨会, 广西桂林, 2010年10月.

