

硕士学位
论文

线粒体移植对水牛卵母细胞发育潜能 影响的初步研究

高亚可

廣西大學

二〇一三年六月

分类号_____

UDC _____

密级_____

硕士学位论文

线粒体移植对水牛卵母细胞发育潜能
影响的初步研究

高亚可

学科专业 _____ 动物遗传育种与繁殖 _____

指导教师 _____ 石德顺研究员 陆凤花研究员

论文答辩日期 _____ 2013 年 6 月 3 日 _____ 学位授予日期 _____

答辩委员会主席 _____ 卢克焕 教授 _____

广西大学学位论文原创性声明和使用授权说明

本人声明所呈交的论文，是本人在导师的指导下独立进行研究所取得的研究成果。除已特别加以标注和致谢的地方外，论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写的研究成果，也不包含本人或他人为获得广西大学或其它单位的学位而使用过的材料。与我一同工作的同事对本论文的研究工作所做的贡献均已在论文中作了明确说明。

本人在导师指导下所完成的学位论文及相关的职务作品，知识产权归属广西大学。本人授权广西大学拥有学位论文的部分使用权，即：学校有权保存并向国家有关部门或机构送交学位论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅，可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索和传播，可以采用影印、缩印或其它复制手段保存、汇编学位论文。

本学位论文属于：

- ☐ 保密，在 年解密后适用授权。
- ☒ 不保密。

(请在以上相应方框内打“√”)

论文作者签名：高亚可	日期：2013.6.13
指导教师签名：张同亮	日期：2013.6.13
作者联系电话：	电子邮箱：

线粒体移植对水牛卵母细胞发育潜能影响的初步研究

摘 要

本研究以水牛卵泡颗粒细胞作为线粒体的来源细胞，初步探讨水牛卵母细胞进行线粒体移植(MIT)对其发育潜能的影响，以期提高水牛卵母细胞的质量和胚胎的发育能力。

首先，探讨了水牛卵泡颗粒细胞的分离培养方法及线粒体活性的检测。结果显示：从卵泡液中分离得到的颗粒细胞活率为 60%左右；采用 DMEM 培养基，颗粒细胞的生长速度和生长状态优于 TCM-199 和 DMEMF12 培养基，细胞培养 24h 后开始零星增殖，3~5d 增殖速度达到高峰；分别对第 1、3、5、7 代颗粒细胞的核型、凋亡率及其线粒体活性分析发现：第 1、3、5、7 代颗粒细胞正常核型比率差异不显著，均在 85%以上；第 1 代颗粒细胞的凋亡率($7.67\pm 0.23\%$)与第三代($7.62\pm 0.36\%$)差异不显著，但与第 5 代($8.26\pm 0.19\%$)和第 7 代($9.35\pm 0.47\%$)相比，颗粒细胞的凋亡率显著上升($P<0.05$)；而线粒体的活性会随着颗粒细胞体外培养代数的增加呈下降趋势。

其次，研究了水牛卵母细胞质量及发育潜能与线粒体 DNA (mtDNA) 拷贝数的关系。通过实时荧光定量 PCR (QRT-PCR) 技术对体外成熟不同级别卵母细胞的 mtDNA 拷贝数进行测定，结合不同级别卵母细胞孤雌激活胚胎的发育情况，分析卵母细胞质量及发育潜能与线粒体 DNA (mtDNA) 拷贝数的关系。结果显示：一级卵母细胞组的平均 mtDNA 拷贝数极显著高于二、三级卵母细胞组(202101 ± 34432 vs 118483 ± 17028 , 39177 ± 7938 , $P<0.01$)，二级卵母细胞组的平均 mtDNA 拷贝数极显著高于三级卵母细胞组(118483 ± 17028 vs 39177 ± 7938 , $P<0.01$)；孤雌激活处理后发现：一级卵

母细胞组的卵裂率和囊胚率也都极显著高于二、三级卵母细胞组 ($P<0.01$), 而二级卵母细胞组激活后胚胎的卵裂率和囊胚率亦都极显著高于三级卵母细胞组 ($P<0.01$)。

此外, 探讨了线粒体移植对卵母细胞发育潜能的影响。主要研究了外源线粒体移植后在早期胚胎中的分布情况, 及 MIT 对胚胎发育潜能及胚胎线粒体膜电位的影响。结果显示: 用 Mito-Tracker 探针标记的外源线粒体经移植后, 会随着胚胎的发育而发生移动, 分布到各个卵裂球中, 至桑椹胚期仍有部分细胞可以观察到微弱荧光, 但随着胚胎的发育荧光强度会逐渐消弱; 孤雌激活处理后发现, 二级卵母细胞 MIT 组囊胚率显著高于对照组和空注组 (27.3% VS 17.4%, 7.84%, $P<0.05$), 而三级卵母细胞 MIT 组的囊胚率与对照组和空注组无显著差异; 对胚胎 $\Delta\Psi_m$ 检测发现, 水牛植入前各时期胚胎 $\Delta\Psi_m$ 总体呈上升趋势, 且 MIT 组的 2-细胞、4-细胞、8-细胞期、桑椹胚期和囊胚期 $\Delta\Psi_m$ 均显著高于对照组 ($P<0.05$)。

以上结果表明: (1) 初步建立了水牛卵泡颗粒细胞的分离培养方法; (2) 培养的第 1~3 代水牛颗粒细胞可用于提取线粒体; (3) 不同质量的水牛卵母细胞其 mtDNA 拷贝数存在显著差异, 且 mtDNA 拷贝数与卵母细胞质量和胚胎发育的能力成正相关; (4) 外源线粒体移植后在胚胎内可以存活一定时间, 并参与了早期胚胎发育的过程; (5) MIT 可以提高水牛二级卵母细胞的胚胎发育潜能。

关键词: 线粒体移植 mtDNA 拷贝数 线粒体膜电位 水牛 颗粒细胞

EFFECTS OF MITOCHONDRIAL TRANSPLANT ON THE DEVELOPMENTAL POTENTIAL OF BUFFALO OOCYTES

ABSTRACT

The aim of present study was to investigate the effects of follicular granular cells (GCs) mitochondrial transplant (MIT) on the developmental potential of buffalo oocytes, in order to improve the quality of buffalo oocyte and the development potential of buffalo embryo.

Firstly, the method of isolation and culture for GCs was explored and the mitochondrial activity of GCs was also detected. The results showed that the viability of GCs obtained from the follicular fluid was about 60%. As to the culture medium, the growth rate and growth density of buffalo GCs culturing in DMEM medium were better than those of TCM-199 and DMEM / F12 culture medium. The GCs began to proliferate after cultured for 24h, and reached a proliferation peak during cultured for 3~5d. Karyotype analysis displayed that beyond 85% of GCs had normal karyotype in the 1, 3, 5, 7 passage, which did not show significant difference among these passages. The apoptosis ratio of the 5 ($8.26 \pm 0.19\%$) and 7 passage ($9.35 \pm 0.47\%$) of GCs was higher as comparing with the 1 passage ($7.67 \pm 0.23\%$) ($P < 0.05$). Moreover, the activity of the mitochondria extracted from different passage of GCs displayed a decreased trend with the increase of the passages in vitro culture.

Secondly, the relationship between the quality, developmental potential of

buffalo oocyte and its copy number of mitochondrial DNA (mtDNA) were investigated. The buffalo oocytes were divided into grade 1, 2 and 3 according to their quality. The results of real-time fluorescent quantitative PCR (QRT-PCR) analysis showed that the average mtDNA copy number of buffalo oocytes in the grade 1 group was evidently higher than that of oocytes in the grade 2 and grade 3 groups (202101 ± 34432 vs 118483 ± 17028 , 39177 ± 7938 , $P < 0.01$), and it was also significantly higher in the grade 2 group than that of the grade 3 group (118483 ± 17028 vs 39177 ± 7938 , $P < 0.01$). Furthermore, the cleavage rate and blastocyst development rate of embryos derived from oocytes in the grade 1 group were significantly higher than those of the grade 2 and grade 3 groups after parthenogenetic activation ($P < 0.01$), and the rates of cleavage and blastocyst of embryos from oocytes in the grade 2 group were remarkably higher than that of the grade 3 group ($P < 0.01$).

Additionally, the effect of MIT on the developmental potential of buffalo oocytes was examined. The results showed that the exogenous mitochondria labeled with Mito-Tracker fluorescent probe distributed into each of blastomeres after MIT, but the fluorescent intensity gradually became weak with the embryonic development, and there were still some faint fluorescent signals observed in the morula embryos. Furthermore, more parthenogenetic embryos could develop to blastocyst stage in the group of grade 2 oocytes after MIT (27.3% vs 17.4%, 7.84%; $P < 0.05$), however, there was no significant difference in the blastocyst rate of the group of grade 3 oocytes after MIT. The $\Delta \Psi_m$ of buffalo embryo presented an increased trend during development of preimplantation embryo, and the $\Delta \Psi_m$ of embryo derived from MIT group in the 2-cell, 4-cell, 8-cell, morula, and blastocyst stage was significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$).

These results indicated that (1) the model of buffalo GCs in vitro culture was preliminarily established, and the 1~3 generations of buffalo GCs were

more suitable cells for extracting mitochondria. (2) The mtDNA copy number of buffalo oocyte is positively related with the quality of oocyte and its subsequent developmental ability. (3) The exogenous mitochondria could survive and participate in the process of early embryonic development. (4) MIT is propitious to improve the developmental ability of the grade 2 buffalo oocytes.

KEY WORDS: mitochondrial transplantation; mtDNA copy number; mitochondrial membrane potential; buffalo; granulosa cell

目 录

摘 要.....I

ABSTRACT.....III

第一部分 文献综述.....1

1 线粒体生物学性状.....1

1.1 线粒体的形态结构和分布.....1

1.2 线粒体的功能.....2

1.3 线粒体遗传特性.....3

1.4 线粒体与细胞凋亡.....3

1.5 线粒体与胚胎发育.....4

2 影响卵母细胞发育潜能的因素.....5

2.1 年龄.....5

2.2 卵胞质.....6

2.3 染色体异常.....9

3 提高卵母细胞发育潜能的方法.....9

3.1 卵胞质移植.....10

3.2 生发泡移植.....11

3.3 线粒体移植.....13

第二部分 试验部分.....16

第一章 水牛卵泡颗粒细胞的体外分离培养及筛选.....18

1. 材料与方法.....19

1.1 实验材料.....19

1.2 主要仪器及试剂.....19

1.3 方法.....21

1.4 统计分析.....23

2 结果与分析.....23

2.1 水牛颗粒细胞的活率及原代培养.....23

2.2 水牛颗粒细胞培养基的筛选.....24

2.3 水牛颗粒细胞的增殖检测.....25

2.4 水牛颗粒细胞的核型分析.....26

2.5 水牛颗粒细胞的凋亡检测.....26

2.6 线粒体的提取及活性检测.....28

3 讨论..... 28

4 结论..... 30

第二章 水牛卵母细胞质量及发育潜能与线粒体拷贝数的关系..... 31

1 材料与方法..... 32

1.1 试验材料..... 32

1.2 主要仪器及试剂..... 32

1.3 试验方法..... 32

1.4 统计分析..... 35

2 结果与分析..... 35

2.1 标准品的制备..... 35

2.2 不同质量水牛卵母细胞的 mtDNA 拷贝数..... 36

2.3 不同级别水牛卵母细胞孤雌激活胚胎的发育..... 37

3 讨论..... 38

4 结论..... 38

第三章 颗粒细胞线粒体移植对水牛卵母细胞的影响..... 39

1. 材料与方法..... 40

1.1 实验材料..... 40

1.2 主要仪器及试剂..... 40

1.3 试验方法..... 40

1.4 试验设计..... 42

1.5 统计分析..... 43

2 结果与分析..... 43

2.1 线粒体移植后的追踪观察..... 43

2.2 线粒体移植对水牛胚胎发育的影响..... 44

2.3 线粒体移植对水牛胚胎线粒体膜电位的影响..... 45

3 讨论..... 46

4 结论..... 48

参考文献..... 49

图片说明..... 55

致 谢..... 56

攻读硕士期间发表学术论文..... 57

英文简写—中文对照表

英文简写	中文对照
MIT	线粒体移植
PCR	聚合酶链反应
Q-PCR	实时荧光定量核酸扩增反应
DNA	脱氧核糖核酸
MtDNA	线粒体脱氧核糖核酸
ROS	活性氧簇
ATP	三磷酸腺苷
JC-1	亲脂性荧光探针
MII	第二次成熟分裂中期
MI	第一次成熟分裂中期
GV	生发泡
GVBD	生发泡破裂
AIF	凋亡诱导因子
Cyto-c	细胞色素 c
Ca ²⁺	钙离子
RNA	核糖核酸
mRNA	信使核糖核酸
IVF	体外受精
BSA	牛血清白蛋白
PI	碘化丙啶
Brdu	5-溴脱氧尿嘧啶核苷
FBS	胎牛血清
GC	颗粒细胞
COCs	卵丘卵母细胞复合体
Ion	离子霉素
6-DMAP	6-二甲基氨基嘌呤
$\Delta\Psi_m$	线粒体膜电位

第一部分 文献综述

1 线粒体生物学性状

线粒体是一种存在于大多数细胞中的，具有双层脂膜包被的细胞器，直径约在0.5~10μm 之间。线粒体是细胞内氧化磷酸化及合成三磷酸腺苷（ATP）的主要场所，为细胞的新陈代谢提供能量，因此又被称为是细胞的“发电站”。线粒体拥有自身的遗传物质和遗传体系，是一种半自主性的细胞器。线粒体最早是在 1857 年被瑞士科学家 Kollicker 发现，之后不断有科学家对其进行研究，但受当时科研条件限制，未能真正了解其生物学结构和功能，直到上世纪 50 年代电子显微镜的诞生，人们才从本质上揭开了许多线粒体的超显微结构和生物学功能。

1.1 线粒体的形态结构和分布

线粒体一般呈短棒状或椭圆状，因生物种类和生理状态不同，也呈线状、环状、哑铃状或其它形状。线粒体由双层磷酸脂膜包被，从外至内可依次分为线粒体外膜、线粒体膜间隙、线粒体内膜和线粒体基质四个生物学功能区（图 1 所示）。线粒体外膜光滑平正，对细胞器其支持和保护作用；线粒体内膜则皱褶弯曲。向内形成线粒体脊，参与大量的生化反应；线粒体基质中含有与三羧酸循环作用有关的一整套酶、蛋白质和各种 RNA 等。

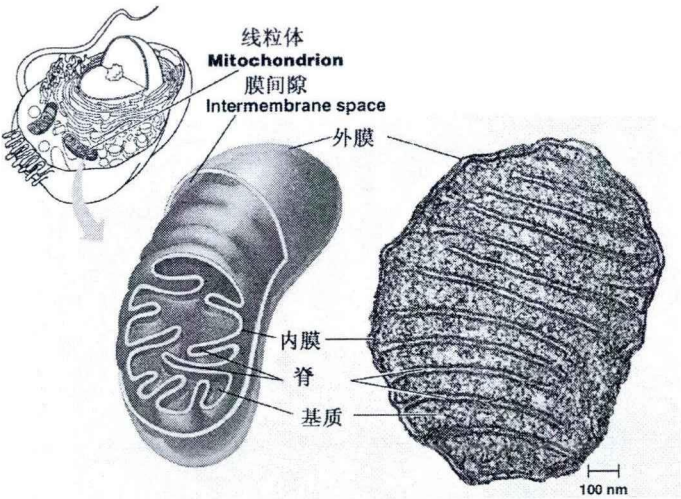


图 1. 线粒体结构示意图

Fig.1. The structure diagram of mitochondria

不同类型细胞中，线粒体的数量也大不相同。大部分体细胞中的线粒体数目约为1000~2000，精子中的线粒体只有 20~30 个，但成熟的卵母细胞中则多达 10 万个。根据

细胞生理功能的不同，细胞内线粒体的含量也不尽相同，细胞新陈代谢旺盛、耗能大的细胞一般含有较多的线粒体；新陈代谢弱、耗能少的细胞线粒体的含量就相对较少。

在细胞中，线粒体通常的分布方向与微管一致，主要分布在细胞功能旺盛的区域。在肾脏细胞中线粒体靠近微血管分布，呈平行或栅状排列；在肠表皮细胞中则呈两极分布，集中在基部和顶端；而在精子中线粒体分布在鞭毛中区。线粒体在细胞中的数量和分布并不是一成不变的。在卵母细胞体外成熟的过程中，Stojkovic 等利用 Mito-Tracker 荧光探针对牛卵母细胞线粒体进行标记并追踪观察，发现随着卵母细胞的逐渐成熟，线粒体从细胞周边逐渐向中间迁移并在胞质中均匀分布，当卵母细胞成熟后，线粒体逐渐聚集在细胞中央；当卵母细胞受精后，线粒体又会成簇聚集在原核周围^[1]。同时，这一规律也在猪、小鼠、人、绵羊等物种中得到证实^[2-5]。普遍认为，线粒体在细胞质中的迁移主要是以微管作为轨道，并在多种蛋白的作用下完成。

1.2 线粒体的功能

线粒体是细胞进行氧化代谢、能量转换的主要场所，是糖类、脂肪和氨基酸三大能量物质最终氧化分解释放能量的部位。线粒体主要负责有氧呼吸反应链的第二、三阶段，及三羧酸循环和氧化磷酸化。能量物质在细胞质基质中完成糖酵解后，以丙酮酸的形式在主动运输的作用下进入线粒体参与三羧酸循环和氧化磷酸化过程，并最终释放能量，其中一部分能量用于合成 ATP，其余部分则作为热能释放，其原理如图 2 所示。同时线粒体具有储存钙离子（Ca²⁺）的能力，参与部分 Ca²⁺的信号传导^[6]，如细胞凋亡机制中 Ca²⁺的信号传导。在细胞内，线粒体可以和粗面内质网、细胞外基质等细胞结构协同作用，进而控制 Ca²⁺浓度的动态平衡。除此之外，线粒体还承担着一些特殊的生理功能：如参与细胞增殖和代谢的调控，合成胆固醇及某些血红素，调控细胞的程序性死亡等。

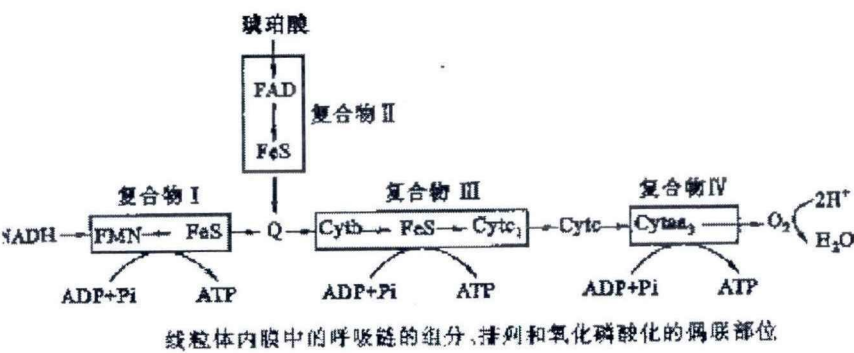


图 2. ATP 合成示意图（引自参考文献^[7]）
Fig.2. The schematic diagram of ATP synthesis

1.3 线粒体遗传特性

线粒体是细胞内除了核以外唯一含有 DNA 的细胞器,但与核 DNA 不同的是其遗传不遵循孟德尔遗传定律,主要为母性遗传^[8]。mtDNA 是一个线性环状的 DNA,其大小因物种不同而已,约为 17kb,其在进化的过程中具有高度的保守性。mtDNA 从结构上分为两条链,即重链(H 链)和轻链(L 链),哺乳动物 mtDNA 在 H 链上有一个特殊的 D 环结构,是区别于其他物种 mtDNA 的标志。目前哺乳动物的线粒体可以编码 22 种 tRNA、2 种 rRNA 和 13 种多肽链,这些多肽链均为氧化磷酸化酶的蛋白质亚基。线粒体可以合成多种蛋白质,并且拥有合成蛋白质所需的一整套“装置”,但由于其自身合成的蛋白质种类有限,远不能满足自身功能需要。由于线粒体自身所需要的大部分酶类物质和 mtDNA 调控因子是由核基因编码完成的,其生长调控受核基因组和自身基因组的双重调控,所以线粒体是一种半自主性细胞器。

线粒体的遗传主要为母系单性遗传,几乎子代所有的 mtDNA 都来源卵母细胞的 mtDNA。线粒体容易发生突变,一般一个生物个体只含有一种 mtDNA,被称为是同质性,但当卵母细胞内的 mtDNA 发生非致死性的基因突变时,在后代个体中就会含有两种以上的 mtDNA,则被称为异质性。线粒体的这种特殊遗传漂变机制同时也是制约雌性动物生殖遗传的一种手段。有学者认为,线粒体的这种特殊机制可以筛选含有正常 mtDNA 的卵子,阻止含有突变型 mtDNA 的卵子产生后代。线粒体 mtDNA 的高突变率主要是有以下几个方面原因:线粒体 mtDNA 不含蛋白质,没有组蛋白的保护作用;mtDNA 不含内含子,是由高度压缩的外显子组成;在线粒体内,mtDNA 长期处在氧化应激的状态下;mtDNA 没有自我修复功能^[9,10]。

1.4 线粒体与细胞凋亡

细胞凋亡(程序性死亡)是细胞在基因的作用下按照一定程序自我破坏,结束存在的过程,对于维持生物体生长发育和体内代谢平衡有着至关重要的作用。诱导细胞凋亡的因素有很多,线粒体在细胞凋亡信号的传导过程中发挥着重要的作用,其参与调控的凋亡途径是细胞凋亡的一个重要途径。线粒体在细胞的凋亡中主要有以下几个作用。① 自由基在细胞凋亡中的作用。线粒体在进行能量代谢的同时,会产生大量的对机体有损伤作用的活性氧(ROS),其对 DNA 有直接损伤作用,可以导致碱基缺失、DNA 断裂、DNA 交联等。另外,ROS 还可以通过对细胞信号通路的调节来介导细胞凋亡的发生^[11]。② 细胞色素 C(Cyto-c)对细胞凋亡的作用。Cyto-c 是氧化磷酸化过程中的一种电子传递

体, 其对诱发细胞凋亡起着关键性作用。当细胞受到凋亡刺激后, 线粒体迅速将 Cyto-c 从内部释放到胞质中, 从而启动凋亡。研究表明, 阻止 Cyto-c 的释放可以起到抑制细胞凋亡的作用^[12]。③凋亡诱导因子 (AIF) 对细胞凋亡的作用。AIF 是线粒体中的一个凋亡诱导因子, 是一种线粒体蛋白, 位于线粒体膜间腔内。当细胞发凋亡时, AIF 快速进入到细胞浆内, 继而进入到细胞核内。AIF 可以细胞核内染色质发生凝集, 并促使核 DNA 的降解。④线粒体 PT 孔道对细胞凋亡的作用。线粒体 PT 孔道是指线粒体内外膜接触点间存在的一种由多种蛋白组成的“运输通道”, 可以允许小分子物质通过。当 PT 孔道开放时, 由于其孔径较大, 使呼吸链作用的一些底物在基质和胞质间达到平衡, 同时造成线粒体 H^+ 梯度消失, 导致呼吸链脱偶联, 无法产生能量, 进而导致线粒体许多功能丧失, 启动细胞死亡^[13]。另外 PT 孔道开放也会造成水和一些溶质进入线粒体, 导致线粒体肿胀破裂, 释放 Cyto-c, 进而导致细胞的凋亡^[14]。

1.5 线粒体与胚胎发育

在卵母细胞和胚胎早期发育的过程中, 线粒体起着至关重要的作用。哺乳动物成熟的卵子中约含有 10 万个线粒体, 研究发现, 在卵母细胞成熟的最后阶段线粒体大量复制积累; 但在随后的胚胎发育过程中, 从 2-细胞期到囊胚期, 胚胎自身线粒体的数量和结构并没有发生明显的改变, 线粒体恢复增殖主要发生在囊胚阶段以后。因此在胚胎发育早期, 胚胎发育的能量供应则主要由卵母细胞本身携带的有限的线粒体提供。Blerkom 等研究指出, 虽然 ATP 含量低的卵子也能正常受精, 但只有当 ATP 含量 $\geq 2\text{pmol}$ 时, 受精卵才容易着床和进行胚胎发育; Blerkom 同时发现, 将外源的线粒体移植到卵母细胞后可明显提高受体卵母细胞内的 ATP 含量, 并且新移的线粒体可以存活 80 个小时以上^[15]。卵母细胞自身 ATP 供给水平的下降会导致其受精能力的下降, 即使可以完成受精但随后胚胎的发育能力也会严重下降, 表现为发育迟缓、停滞。因此, 有人提出通过人为方法将线粒体植入卵胞质内为其补充额外能量, 从而改善胚胎的发育能力。国内外一些研究表明: 线粒体移植 (MIT) 可以一定程度改卵子质量和胚胎发育能力, 有效的提高了优质胚胎获得率。多项研究表明: 卵胞质中线粒体数量减少、分布异常、mtDNA 含量的降低和 mtDNA 的突变等, 都将会导致纺锤体形成障碍、减数分裂停滞或延迟, 以及染色体提前分离或不分离, 从而严重影响卵子的质量和以随后胚胎的发育能力^[16-19], 是老龄雌性动物生殖机能下降的主要原因之一。

2 影响卵母细胞发育潜能的因素

随着辅助生殖技术在临床上的广泛应用,使越来越多的患者成功妊娠,但大龄女性的低妊娠率却一直困扰着医学工作者们。目前,大龄妇女和雌性动物生育能力下降和丧失已被人们广泛认可。研究表明,引起雌性动物生育能力下降的原因主要包括卵巢、输卵管和子宫等生殖器官的结构、功能障碍,卵母细胞的数量和质量下降等因素,而卵母细胞质量的下降被普遍认为是引起生育能力的下降主要原因^[20, 21]。

2.1 年龄

目前随着生活节奏的加快和人们生育观念的改变,尤其是在城市,越来越多的女性生育年龄逐渐提高。但生育年龄越高生育能力越低、风险越大,子代遗传疾病的概率也越大,尤其是35岁以上的大龄女性。焦泽旭等以36岁以上大龄妇女为研究对象,在排除男性方面因素下详细分析了年龄因素对体外受精-胚胎移植(IVF-ET)效果的影响,结果发现:不同年龄患者在卵母细胞的成熟率、受精率,卵裂率以及移植胚胎数目上并无显著差异,但妊娠率和流产率却随着年龄的增加而差异显著,妊娠率由24.1%(36岁)下降至9.8%(40~55岁);流产率则由23.0%(36岁)上升至43.3%(40~55岁)^[22]。导致大龄妇女生殖能力降低的原因主要有两个方面,分别是卵子质量和子宫内膜的可接受性。在卵母细胞的减数分裂中,细胞内聚集的过氧化物对细胞有一定的损伤作用,可以导致细胞染色体非正倍率增加,进而降低卵子质量和随后胚胎的活性^[23],而这种损伤作用会随着年龄的增加而增强。在子宫内膜接受性方面,子宫内膜随着女性年龄的增加而发生一系列生理结构和功能上的变化。这些生理和功能上的改变一定程度上会导致大量妇女子宫内膜接受性下降,胚胎着床能力下降^[24]。然而,当将年轻女性卵子体外受精的胚胎移植给大龄妇女发现,妊娠率和分娩率与使用自身胚胎移植相比有极显著差异^[25]。与此同时,对大龄妇女进行卵胞质移植来改善卵子质量,已获得成功,并有多例卵胞质移植婴儿诞生。这些研究表明了,大龄妇女或雌性动物生殖机能的下降可能主要是由于卵子质量的下降引起的。

此外,随着女性年龄的增大,卵母细胞储备数量逐渐减少,这也是造成大龄女性和雌性动物生育能力下降的一个重要原因。在对老龄小鼠进行卵母细胞体外成熟培养时发现,从老龄小鼠卵巢中获得的卵母细胞数量明显少于年轻小鼠(13 ± 7 VS 34 ± 3)^[26];在体外成熟排除第一极体率方面,老龄小鼠显著低于年轻小鼠($P < 0.05$)^[27]。因此,年

龄因素不仅与收集到的卵母细胞数量有关,还与卵母细胞体外成熟培养时排除极体的能力有关。另外有研究表明,随着母体年龄的增长,卵母细胞体内和体外的受精能力都会呈下降趋势^[28,29]。同时,年龄因素还与纺锤体形成异常和染色体排列异常有关。随着母体年龄增加,植入前胚胎容易发生发育阻滞,形态异常率和非正倍体率增加^[30]。

2.2 卵胞质

哺乳动物卵母细胞成熟分为胞质成熟和胞核成熟,只有在二者的共同作用下,卵子才能完成受精和随后的胚胎发育。有些卵母细胞虽然完成了核成熟,但因其细胞质未达到成熟或已处于过成熟状态,卵子完成受精后不能正常发育,即便可以进行早期发育,移植后也不能着床^[31]。哺乳动物卵母细胞中含有大量的蛋白质、mRNA、mtDNA以及各种因子,这些母源性的物质在其生长发育、受精和随后的胚胎发育中都起着至关重要的作用^[32]。研究表明:胚胎发育到8-细胞期以后,其基因组开始被激活转录,其发育几乎完全依赖于卵母细胞内的这些母源性物种^[33]。此外,卵胞质中还含有大量的“母源性信息”,对卵母细胞的发育成熟、受精和早期胚胎发育起着重要的调节作用。

2.2.1 胞质含量

卵子在完成受精后,随着胚胎的发育,卵子中含有的胞质会被不断地分配到各个卵裂球中,直到核质比达到体细胞水平。研究表明,在卵母细胞成熟和胚胎发育的过程中,细胞质和细胞核之间的比例和相互作用关系起着重要的调控作用。有人将小鼠生发泡期(GV)卵母细胞按一定的比例切割后培养发现,随着卵胞质含量的减少,生发泡破裂(GVBD)发生的时间会逐渐推迟。但进一步延长培养时间后,1/1、1/2、1/3和1/4胞质含量的卵母细胞都会发生生发泡破裂,且各组发生GVBD比例呈逐渐升高,而几乎不含卵胞质的生发泡核体则不会发生GVBD。同时,随着卵胞质含量的减少,卵母细胞发育到MII期的比率明显下降;将含有1/4胞质的卵母细胞与去核的卵母细胞融合在一起,1h后发生了GVBD,有76%的融合体完成成熟^[34]。因此,一定比例的胞质含量是卵母细胞发育成熟的必须条件,随着胞质含量的减少,卵母细胞发生GVBD和完成成熟的能力下降。卵母细胞成熟与卵胞质的作用机制目前尚不清楚,细胞周期受多种调控因子的控制,已表明多种调控因子存在细胞质中,如周期蛋白B/Cdc2^[35]。因此,减少卵胞质的含量也一定程度上减少了细胞内各种调控因子的含量,调控因子含量的减少则难以完成对卵母细胞发育和成熟的调控作用。除此之外,细胞质中还含有多种mRNA、

蛋白质及细胞因子，这些物质对卵母细胞的发育成熟都起着重要的作用^[34]。

对于成熟卵母细胞或受精卵，减少其胞质含量会严重影响受精效果和胚胎的发育水平。Northey 等将牛卵子胞质减去一半后进行体外受精，其随后的胚胎发育率以及桑椹胚、囊胚期细胞数明显低于对照组^[36]。同样，将体外受精的牛原核时期胚胎胞质含量减少一半，其胚胎发育率及囊胚细胞数显著低于对照组^[37]。这一结果也存在于 2-8cell 期胚胎中，减少各时期胚胎卵裂球中的胞质含量，胚胎发育能力明显下降^[38-40]。在小鼠中，虽然 2-4cell 期胚胎卵胞质二分后对期囊胚发育率无显著影响，但胚胎质量和胚胎移植后的妊娠率却差异显著^[41]。在体细胞核移植中，受体的细胞质可以使供体细胞核溶解、染色体凝集并发生基因重组，同时供体核也会释放一些蛋白类物质进入细胞质。核移植重构胚胎的发育能力主要靠二者之间的相互作用和“默契”，而这种“默契”则主要靠卵胞质对供体核的供给、支持和重编程作用。移植中，去核是一项关键技术点，由于目前传统核移植主要依靠显微操作仪器，会不同程度对卵母细胞造成损伤，使部分卵胞质减少，进而对重构配的发育产生不利影响。研究发现，用其它卵母细胞胞质填补去核过程中的卵胞质损失，可以显著提高核移植重构胚的发育能力，卵裂率由 32%提高至 60%，桑椹胚和囊胚率也由 14%提高到 38%^[42]。目前，人们普遍选择在 MII 期对卵母细胞进行去核，此时的纺锤体中含有的大量胞质，容易造成胞质量减少，Bordignon 等则选择在牛卵母细胞第二次减数分裂后去核，以便减少去核时胞质的损失，结果发现囊胚发育率由前者的 16%提高到 38%^[43]。因此，在体细胞核移植中，通过增加卵胞质的含量可以一定程度改善重构胚的发育能力，但周琪等研究指出，受体卵胞质过多时亦会降低核移植重构胚的发育潜能^[44]。由此说明，核移植中卵胞质含量的多少对基因组重编程和重构胚的发育能力有着重要的影响。

2.2.2 线粒体

在胚胎的发育过程中，卵胞质中的线粒体发挥着关键性作用。线粒体除了参与氧化磷酸化，为胚胎的发育提供必不可少的能量（ATP）外，线粒体还在其他方面发挥着重要作用。主要包括氧化还原的调节、活性氧物质的产生、氧气的消耗、类固醇激素的合成、糖基化和细胞程序性死亡的控制。研究发现，线粒体的活性与 8-cell 期前胚胎继续发育的能力有很大关系，线粒体活性降低，胚胎发育迟缓、且容易在 8-cell 期前发育停滞^[45]。同时，一切导致线粒体结构和功能变化的因素都会严重影响胚胎的发育潜能，主要包括 mtDNA 含量减少和 mtDNA 突变。

研究证实,哺乳动物成熟卵母细胞中含有 10-20 万个线粒体基因组, mtDNA 对卵子的受精能力和胚胎发育能力发挥重要作用^[46]。在卵母细胞的体外成熟培养中,核成熟和胞质成熟是卵母细胞具有良好发育潜能的基础,细胞核成熟通常可以以排除第一极体作为标准,但胞质成熟却没有一个很好的衡量标准,而卵胞质成熟又对卵母细胞的受精能力至关重要。通过对临床大龄不孕以及多次受精失败患者的研究发现,此类患者与健康女性的卵母细胞中 mtDNA 的含量有明显差异^[17]。在卵母细胞的生长发育中,其快速生长的阶段主要在卵泡成熟期,此时的卵母细胞不仅会发生一些形态上和功能上的变化,还包括线粒体的生物合成和 mtDNA 的复制。在卵母细胞成熟的后期阶段,线粒体开始进行大量增殖,由起初的几十个增值到数十万之多,因此线粒体的大量积累也可能是卵母细胞成熟的一个标志^[47]。有人研究也发现,小鼠卵母细胞在体外成熟培养条件下,可以完成成熟的卵母细胞 mtDNA 拷贝数显著高于未能成熟的卵母细胞 mtDNA 拷贝数,但在随后的胚胎发育过程中,在囊胚阶段以前,线粒体几乎不再发生增殖。因此,成熟前功能性线粒体的积累对卵母细胞的受精和胚胎发育至关重要。低含量 mtDNA 的卵母细胞可能导致线粒体活性下降及卵胞质成熟不完全,从而导致卵母细胞的受精能力和胚胎发育能力下降。

另外,mtDNA 缺失或突变的积累可能是造成线粒体合成能力下降,功能性线粒体数量减少的原因之一。研究表明, mtDNA 的变异会一定程度导致成熟期卵母细胞内线粒体功能的丧失,造成线粒体代谢紊乱,进而影响卵母细胞和早期胚胎中相关基因的表达水平,导致卵母细胞功能异常^[48]。卵母细胞中的线粒体 DNA 是子代细胞线粒体 DNA 的唯一来源,正常的 mtDNA 遗传是保证物种能够生存和繁衍的基础。研究发现,如果缺陷型母源 mtDNA 在子代的卵巢或睾丸上表达则会导致子代的不育^[49],但发生这种情况的概率很低。因为雌性动物生理机制中可能有以下 3 中途径来避免这中缺陷型 mtDNA 的遗传:①卵泡发育过程中,含有异质性 mtDNA 的卵母细胞会导致其发育闭锁;②在卵母细胞 mtDNA 复制过程中,少量突变的 mtDNA 会被过滤并降解。③在胚胎发育过程中,含有缺陷 mtDNA 的胚胎容易发育阻滞,最终死亡^[49]。大量研究表明,女性卵母细胞 mtDNA 部分基因的缺失可以发生在各个年龄阶段,这种缺失的有无与年龄无明显的关系^[50],但缺失的 mtDNA 占总 mtDNA 的比例很低,只有 0.01%~0.1%。说明卵母细胞与体细胞一样可以存在非致死性 mtDNA 突变。但也有研究表明,一些卵母细胞 mtDNA 基因的共同缺失与女性或雌性动物的年龄有关,随着女性或雌性动物年龄的增加,卵母细胞内线粒体的功能和活性逐渐下降,而且 mtDNA 的突变率和缺失率会逐渐

增加, mtDNA 的缺失积累可以作为卵母细胞功能衰退的标志^[51]。虽然在生育期的卵巢就已经存在 mtDNA 的突变,但这种突变与老龄动物 mtDNA 突变存在量的差异,不足以影响线粒体功能和卵母细胞的发育能力,可能只有当其突变积累达到一定的阈值时才会影响卵母细胞的发育潜能。

2.3 染色体异常

随着雌性动物年龄的增长,卵母细胞的发育潜能会明显下降,除了卵胞质对其产生重要影响外,减数分裂异常所导致的非整倍体性对老龄动物的卵母细胞发育潜能下降也起到了重要主导作用。临床研究发现,随着年龄的增长,卵母细胞和早期胚胎染色体非整倍体以及的染色体断裂发生的机率会显著增加^[52, 53],而染色体的非整倍体是导致自然流产的重要原因^[54]。研究发现,35 岁以上妇女卵母细胞排除的第一、第二极体的非整倍体率分别高达 21.8%和 20.3%^[55]。Eichenlaub-Ritter 等对 4000 多个老龄妇女的卵母细胞核型进行了核型分析,结果发现:有 8.6%的卵母细胞染色体为超倍性,有 13.5%的卵母细胞染色体为低倍性^[56]。在小鼠中,年龄的增长也同样导致卵母细胞和植入前胚胎的非整倍体增加^[30],但增长速度相对于人类要缓慢的多。因此,随着年龄的增长,雌性动物的卵母细胞染色体异常率都会出现不同程度的增加,进而导致卵母细胞受精能力下降,胚胎发育阻滞。

3 提高卵母细胞发育潜能的方法

随着女性年龄的增长,其生育能力明显下滑,卵子老化进程加速,卵子受精和胚胎发育能力降低。研究表明,当女性年龄超过 40 岁后,有近一半的女性会失去生育能力。但是随着现代生活节奏的加快,很多女性生育观念发生变化,许多女性 30 岁以后才计划生育,而此时女性的生殖能力已经出现一定程度的下降,妊娠率低且后代发生遗传疾病的概率升高。同时在现代动物繁殖育种和特种濒危物种人工繁育方面,也遇到了同样的问题,卵子质量下降严重制约着品系改良的进程和濒危物种的保种工作。因此,如何改善卵母细胞质量,提高胚胎发育能力是近几十年来在生殖医学和动物繁殖育种领域工作者们研究的重点。随着显微操作技术和现在细胞遗传学的开展,人们开始尝试用各种方法改善卵母细胞的质量,并取得了一定的进展。根据影响卵母细胞质量的核内外因素,人们主要通过以下几个途径来消除核内外不利因素的影响,如卵胞质移植、生发泡移植和线粒体移植等。

3.1 卵胞质移植

卵胞质移植(ooplasmic transfer)主要是借助显微操作技术将供体卵母细胞的部分卵胞质移植到受体卵母细胞中,并对重构卵进行单精子显微注射受精的过程。自 Cohen 等首次将年轻妇女卵母细胞部分胞质移入老龄妇女卵母细胞并成功获得受精卵以来,国内外已相继有 30 多个卵胞质移植的婴儿和一部分动物出生^[57, 58]。由于移植的卵胞质中含有外源性的 mtDNA, 供体的卵胞质起到了一定的遗传修饰作用,因此许多学者又把卵胞质移植的婴儿叫做“3 亲婴儿”。卵胞质移植可以改善受体卵母细胞质量,使发育阻滞的卵母细胞和胚胎恢复继续发育的能力^[57, 59],这可能是由于老龄妇女(受体)卵胞质中缺少的一些成份可以从年轻妇女(供体)卵胞质中得到补充。许多学者也通过卵胞质移植来研究卵母细胞核质互相以及卵胞质对卵母细胞及胚胎发育能力的影响机制。

1997 年, Cohen 等首次利用卵胞质移植技术将年轻妇女部分卵胞质移入老龄妇女卵胞质内,并成功使重构卵获得受精^[59]。此后, Dale 等人对一位多次体外受精失败的患者进行了乱胞质注射并获得了成功。结果显示,卵胞质移植后患者胚胎碎片明显减少,胚胎的质量也显著提高,4 枚卵胞质移植胚胎移植后,患者成功受孕并诞生了一对健康的双胞胎^[60]。此外,研究还发现,冷冻保存的卵母细胞也具有提供可移植卵胞质的能力,且冷冻保存的卵母细胞操作方便,不需要和受体进行过同期化处理,卵胞质移植时,只需解冻即可^[61]。随后,卵胞质移植技术在日本也成功使大龄不孕患者、老龄牛等动物的卵母细胞获得受精,并部分获得妊娠。目前卵胞质移植技术中,通常采用的有两种移植方法:一种是利用显微注射将一定量(10%左右)供体卵胞质注射到受体卵母细胞的透明带下,再通过电融合的方法将二者的胞质融合在一起,但这种方法的操作程序复杂,受到多重因素影响,移植后受精效果不稳定;另一种也是目前普遍采用的一种移植方法,即借助显微注射技术将一定量的供体量卵胞质和单个精子一同注入受体卵母细胞胞质内,该方法操作程序相对简单,且重构胚的受精效果显著优于前者。Cohen 等^[62]对两种胞质移植方法对比发现,在进行透明带下移植的 22 个卵子中,仅有 5 个卵子出现正常原核和第二极体,另有 10 个卵子只有第二极体没有正常的原核形成,只有模糊的“类原核”形成。而进行卵胞质内注射的 48 个卵子中有 30 个正常受精,与前者受精率相比(5/22)差异显著。目前在进行胞质内注射移植时,同一个供体卵母细胞可以抽取多次的卵胞质,注射到多个不同的受体卵母细胞中。为了使移植的卵胞质能在受体细胞中充分发育,移植的卵胞质要从供体卵母细胞极体的对侧吸出,移入受体细胞的极体附近。

卵胞质移植可以明显改善老龄妇女卵母细胞的受精能力和胚胎发育质量,但其究竟是一个什么样的作用机制至今尚不清楚。在临床中,有一些患者经过多次体外受精或者单精子显微受精均未能成功,可能是先天性卵胞质缺的一种表现;另外随着年龄的增长,一些大龄女性和老龄动物卵母细胞成熟质量明显下降,其受精能力和胚胎发育能力也随之下降,这些影响似乎跟卵胞质的成熟不完全有关。虽然卵胞质移植对早期胚胎发育的具体影响机制尚不清楚,但卵胞质移植似乎可以一定程度上纠正受体细胞的卵胞质缺陷,并提高的胚胎的发育能力。作为移植的供体卵胞质中含有 mRNA、蛋白质、线粒体和一些细胞因子,但普遍认为是线粒体发挥了关键的作用。年轻女性卵胞质的线粒体活性高、质量好,移植后可以改善受体卵母细胞中线粒体的功能水平,为胚胎的早期发育的各种生物作用提供能量保障。但也有学者认为线粒体并非卵胞质移植中唯一起重要作用的因素,或许年轻女性卵胞质中含有一些尚未明确的调控因子,可以防止卵子老化并抑制胚胎发育中胚胎碎片的产生,进而抑制胚胎的凋亡。因此,关于卵胞质移植对改善卵母细胞质量的具体机制尚需进一步研究。

本世纪初,卵胞质移植还一度用于人类辅助生殖技术中以改善卵子发育潜能,但随后由于存在伦理上诸多争议,相继被各国规定停止其临床应用。人们发现,虽然部分“3亲婴儿”出生时脐带和胎盘血液中只含有受体母亲卵母细胞 mtDNA,但也有的卵胞质移植婴儿,可以在其血液中同时检测到受体和供体母亲的卵母细胞 mtDNA^[63],这也说明了卵胞质移植中的线粒体可以在受体卵母细胞中存活很长时间,并能一同接收受体卵母细胞核的调节分化。虽然大量的外源 mtDNA 会被降解掉,但有少部分线粒体可以被“接受”并“同化”,能够在胎儿发育的过程中进行自我的生物合成和复制。对于这一现象,有的学者认为这种少量的外源性 mtDNA 不会对人体的生理功能构成危害^[58],因为正常的生物个体自身的 mtDNA 也会存在一定的变异性,并会逐渐被机体自我清除,且资料显示,含有供体母亲 mtDNA 的卵胞质移植婴儿到目前一直很健康。但也有学者认为,这种外源性的 mtDNA 会对个体的基因组产生一定的影响,并使其外在的性状发生某些改变,并会将这种遗传缺陷传给下一代^[46]。

3.2 生发泡移植

生发泡(GV)移植是上世纪末开始建立起来的一种新型的技术,它对于研究减数分裂期间核质互作的相互关系有着重要的作用,同时它可以一定程度纠正因减数分裂异常而导致卵母细胞的发育缺陷。卵胞质移植虽然一定程度上可以改善因胞质因素而导致

的卵母细胞发育潜能不足,但无法纠正因 MI 期染色体分离异常而导致的卵母细胞受精和胚胎发育的丧失。生发泡移植主要分为两种时期的移植,一种是 GV 期卵母细胞的生发泡移植,即将 GV 期卵母细胞的生发泡核移植到 GV 期去核的卵母细胞内,从而形成重构卵母细胞;另一种则是 MII 期卵母细胞的生发泡移植,即将 GV 期卵母细胞的生发泡核移植到 MII 期去核的卵母细胞中形成重构卵母细胞。目前,生发泡移植已在人^[64, 65]、小鼠^[66, 67]、兔^[68, 69]和牛^[70-72]等物种上进行了相关研究,并且已经有经生发泡移植的兔诞生。

对于 GV 期卵母细胞的 GV 移植,已经在许多物种做了研究,并取得了一定的进展。在小鼠上,这种方式获得的重构卵经体外成熟后(IVM),能够发育到 MII 期并排出第一极体,其成熟率与不进行生发泡移植的卵母细胞无明显差异。同时还发现,重构卵在体外成熟过程中不会受到受体胞质体的异源性线粒体影响,且重构卵经体外培养成熟后,线粒体主要存在 MII 期纺锤体周围^[73]。在牛上,人们发现经生发泡移植的重构卵在体外条件下也同样能够完成成熟过程^[71]。在兔上,经生发泡移植的重构卵不但可以在体外完成成熟,而且对其进行胞质内单精子注射后成功受精,受精卵可以发育至囊胚阶段,经移植后,成功妊娠并出生 2 个后代^[68]。同时生发泡移植也可在异种动物之间进行。有学者将小鼠的生发泡核移植到去核的兔 GV 期卵母细胞中,经体外成熟培养后发现,这种异种重构卵也具有在体外成熟的能力^[69]。虽然 GV 期生发泡移植的重组卵可以在体外正常成熟,但这种重组卵得的受精和胚胎发育能力会受到伤害。GV 移植时必须收集 GV 期的卵母细胞,并且移植后的重组卵又必须在体外培养成熟,但 GV 期卵母细胞尚未受到促性腺激素峰作用的影响,失去了和促性腺激素直接和间接的作用,而这些促性腺激素的调节作用对于卵母细胞最后的成熟至关重要,因此不可避免的影响了其正常的生理功能。同时,在进行期卵母细胞生发泡移植时,又不可避免的损害了其周围的卵丘颗粒细胞,而卵母细胞和卵丘颗粒细胞之间的间隙连接和相互作用对卵母细胞的发育成熟和生理功能有着诸多方面影响。

对于 MII 期卵母细胞的生发泡移植,研究发现,重构卵能完成生发泡破裂,但不能完全成熟。研究发现,将小牛的 GV 核移植到成年牛的去核 MII 期卵母细胞内,获得的重构卵经体外受精和体外培养后,卵裂率仅为 40%,其成熟率和卵裂率均低于未进行生发泡移植的牛卵母细胞^[72]。对于不同物种间的生发泡移植,有人将小鼠的 GV 核移植到去核的兔 MII 期卵母细胞中,获得的重构卵经体外成熟培养可以发生生发泡破裂,但不能完成成熟。因此,对于哺乳动物的卵母细胞,调节其减数分裂的卵胞质因子可能不具

有物种的特异性,对于 MII 期的卵母细胞,这些调节分裂的卵胞质因子主要存在于减数分裂器及其周围的卵胞质中^[69]。另外在对生发泡移植的显微操作过程中,一般会除去卵母细胞周围的颗粒细胞以方便显微操作的进行,而卵丘颗粒细胞细胞在卵母细胞的成熟过程中发挥着至关重要的作用,失去卵丘颗粒细胞的重构卵在体外成熟培养时也会受此影响。

研究发现,随着女性和雌性动物年龄的增加,卵母细胞染色体非整倍性的发生几率会显著升高。人们尝试通过生发泡移植,将大龄妇女的卵母细胞 GV 核移植到年轻女性去核的 GV 期卵母细胞中以期减少减数分裂异常的发生。Zhang 等^[65]将大龄妇女(≥ 38 岁)的 GV 移植到年轻妇女(≤ 31 岁)去核的 GV 期卵母细胞中,重组的卵母细胞可以成熟到 MII 期,且有 4/5 具有正常的核型,而对照组卵母细胞(≥ 38 岁)只有 2/7 具有正常核型。Takeuchi 等^[64]将大龄妇女(平均年龄为 37.5 岁)的 GV 核移植到年轻妇女(平均年龄为 30 岁)去核的 GV 期卵母细胞中,能够体外成熟的重组卵有 2/2 具有正常的核型;而年轻妇女的 GV 核移植到老龄妇女去核的 GV 期卵母细胞中,成熟的重组卵中只有 1/3 显示正常的核型。这一结果表明年轻妇女的卵胞质具有支持移植的老龄妇女生发泡正常减数分裂的能力,相反,老龄妇女的卵胞质则可能具有诱导减数分裂中染色体异常的作用。

因此,生发泡移植理论上可以用于改善女性或大龄雌性动物因减数分裂中染色体异常而导致的生育能力下降。但如果这种假设可行的话,那么重构卵就必须具有受精和胚胎发育的能力。Bao 等^[74]将重组的小鼠 GV 期卵母细胞进行在体外成熟培养后体外受精,结果可以形成雌原核和雄原核的重构卵比率分别为 94% 和 78%。Takeuchi 等^[64]将人的 GV 期重构卵体外成熟后,进行胞质内单精子注射,结果重构卵的存活率为 77%,受精率为 52%,且受精卵的卵裂率高达 93.8%,但能发育到 8-细胞和桑椹胚的受精卵很少,这与对照组卵母细胞无明显差异,这一结果表明由生发泡移植的重组卵具有在体外成熟和显微受精的能力。在兔上, Li 等用相同的方法进行了研究,结果重构卵的存活率为 68%~75%,卵裂率为 56%~65%,囊胚率为 7%~9%,与对照组无明显差异。其将 93 个受精的重构卵植入 6 只受体兔后,成功生出了 2 只后代^[68]。综上表明,经生发泡移植的重组卵母细胞具有在体外成熟、受精和胚胎发育的能力。

3.3 线粒体移植

综合上述内容可知,成熟卵母细胞质量对于其受精和随后的胚胎发育起着决定性的

作用,而且随着年龄的增长,女性和雌性哺乳动物的卵母细胞无论是从数量还是质量上都会出现一定程度的下降,并导致生育能力的降低。因此,如何提高卵母细胞质量、提高大龄女性的生育能力也一直是困扰广大科研工作者的一项难题。虽然卵胞质移植和生发泡移植可以一定程度上改善卵子的质量,但两者都需要供体卵母细胞来提供卵胞质或GV核,对材料要求高且操作过程繁琐,而线粒体移植则可以避免这些问题,且线粒体来源细胞多为颗粒细胞,取材方便。在胚胎发育的过程中,能量供应是保证各项生物合成和新陈代谢的基础,但由于线粒体大量增殖一般发生在囊胚阶段,前期胚胎中线粒体几乎没有数量上的变化,因此只能靠卵母细胞自身所携带的有限的线粒体来提供,同时,线粒体的功能状态、mtDNA的缺失或突变也会导致胚胎发育受阻。

在生物体正常受精过程中,精子会携带少量的线粒体进入卵母细胞中,但随后父源的线粒体会被卵母细胞内一些蛋白酶特异性的降解掉,在胚胎早期发育中父源mtDNA即被清除干净,因此子代只保留母源线粒体^[46]。但随着卵胞质移植的研究,移植的卵胞质中含有外源的线粒体,并且少量外源线粒体可以进行自我的生物合成和复制,并能遗传给后代;另外在体细胞核移植中,供体细胞的mtDNA也能少量存在并遗传给后代,且对后代个体的健康无明显影响^[75]。这一结果似乎表明,在受体卵母细胞内没有生物学机制上可以彻底破坏外源线粒体的酶类存在,受体卵母细胞胞质对外源线粒体具有一定程度的可兼容性,这也为线粒体移植的可行性提供了理论基础。

Blekrom等^[15]将从小鼠卵母细胞中分离出来的富含线粒体的胞质体注入到MII期卵母细胞中,通过激光共聚焦显微镜追踪发现,移植的线粒体可以逐步从注射的部位向胞质中其它部分移动,并且可以持续长达80小时以上。对移植后卵母细胞的ATP含量研究表明,线粒体移植36h后卵母细胞的ATP含量比对照组卵母细胞平均多出40~90fmol(10^{-15} mol),且有30%的移植后卵母细胞的ATP含量比平均值高出100fmol以上。结果表明在一定时间内,线粒体移植后卵母细胞内的ATP含量明显增多,且移入的线粒体具有持续的活性并可以发挥其生物学作用。

除了卵母细胞线粒体外,体细胞线粒体也可以用于移植。在颗粒细胞方面,我国台湾的曾启瑞教授在2001年首次报道了使用患者自体颗粒细胞线粒体进行移植成获得妊娠^[76]。孔令红等也报道了通过自体颗粒细胞线粒体移植已使多例患者获得了临床妊娠并分娩,他们对大龄不孕或是多次胚胎移植失败的18例患者进行自体颗粒细胞线粒体移植,其中有8例妊娠,4例双胞胎,且有3例42岁以上患者,年龄最大的患者46岁^[77]。线粒体移植可以明显改善胚胎的发育质量和移植后的妊娠率,对于大龄不孕或是多次胚

胎移植失败的患者，线粒体移植可以作为一种有效的治疗手段。在小鼠上，刘锋等报道，对老龄小鼠进行线粒体移植后的囊胚率为 34.54%，显著高于对照组的 22.98%^[78]。Yi 等分别对年轻小鼠和老龄小鼠的卵母细胞进行线粒体移植，结果发现，年轻小鼠组囊胚率显著高于对照组，老龄小鼠组囊胚率异极显著高于对照组^[79]。在黄牛，王晓磊等尝试对黄牛卵母细胞进行异体颗粒细胞线粒体移植，后进行孤雌激活，结果发现，线粒体移植组的桑椹胚率极显著高于对照组^[80]。在肝脏细胞方面，Irwin 等从小鼠的肝脏组织提取的线粒体，后将线粒体移植到另一品系小鼠的原核期胚内，胚胎移入后成功产下含有外源线粒体的小鼠^[81]。因此，卵母细胞对于线粒体具有一定的兼容性，无论是自体颗粒细胞还是异体颗粒细胞线粒体移植对于改善卵母细胞发育潜能都起到了一定的作用。

第二部分 试验部分

前言

水牛是我国南方重要的家畜,目前我国拥有水牛 2000 多万头,数量位居世界第三,具有巨大的潜在经济价值。然而目前水牛的繁殖率很低,种群的生产性能低劣,且水牛卵母细胞在体外的成熟和受精(IVF)效果都不如黄牛,体外培养过程中,大量早期胚胎停滞死亡,优质胚胎的获得率很低^[82]。因此,如何提高水牛卵母细胞的质量和发育潜能,是现代动物繁育新技术能够在水牛上得以广泛开展的前提。在卵泡发育过程中通过自身的闭锁机制防止质量差的卵子发育成熟或排卵,而选择线粒体活性高、数量充足,mtDNA 正常的高质量的卵子发育成熟。但目前在临床辅助生殖和动物繁殖育种中,使用的卵母细胞材料多为通过超数排卵或者从屠宰场采集的卵巢中获得,绕过了动物自身这种特殊机制的筛选作用。因此,这些卵母细胞的质量不一,体外成熟培养的效果也有很大差异,质量往往低于自然成熟排出的卵母细胞,从而严重影响了胚胎的发育能力。同时,随着雌性动物年龄的增长,卵子老化加速,质量也明显下降^[83]。这可能是由于卵母细胞内线粒体数量减少或 mtDNA 缺陷造成的线粒体功能异常,产生 ATP 的能力不足,从而影响正常染色体的分离、线粒体生物合成和细胞各种生理活动的维持^[16, 18, 19]。

Blerkom 研究发现,ATP 的供应能力对于卵母细胞的受精和早期胚胎发育至关重要,ATP 含量低的卵子虽然也具有一定的受精能力,但仅当 ATP 含量 $\geq 2\text{pmol}$ 时,受精卵才容易着床和继续发育^[15]。因此,卵母细胞中线粒体的数量和活性是 ATP 供应能力的前提。研究表明,在胚胎发育早期,尤其是 4-8 细胞期,胚胎发育需要大量的能量,如果能量供给不足,胚胎就会分裂减缓,染色体非整倍体率增加,继而发育阻滞。卵母细胞在发育成熟的最后阶段,线粒体会大量的增殖和积累;待卵母细胞成熟后,直至囊胚阶段线粒体几乎没有数量上的变化,只是被不断地分配到各个卵裂球中。因此,在植入前胚胎的发育中,ATP 的供应只能靠卵母细胞自身携带的有限的线粒体提供,在此过程中,若线粒体数量或功能缺陷造成供能不足,胚胎就会停止发育^[84]。

Cohen 等在 1997 年首次报道卵母细胞胞质移植获得成功,他们将年轻女性卵子胞质的 10%移植到老龄妇女卵子中成功获得妊娠。自此,已经相继有 30 多个经卵胞质移植的婴儿和部分哺乳动物出生。虽然被移植的卵胞质中含有线粒体、mRNA、蛋白质及细胞因子等成份,但普遍认为起主要作用的是线粒体^[60, 61],并随着线粒体移植技术的发展得到证实。我国台湾曾启瑞教授在 2001 年首次报道了患者自体颗粒细胞线粒体移植

(MIT) 后成功获得妊娠的临床报道^[76]。2003 年, 我国大陆首例 MIT 的双胞胎顺利出生并且健康状况良好^[85]。孔令红等 2004 年报道, 对患者进行 MIT 优质胚胎获得率为 59.4%, 显著高于对照组的 34.9%, 且 18 例患者中有 7 例获得妊娠^[82]。在小鼠, 刘锋等报道, 对老龄小鼠行 MIT 组的囊胚率为 34.54%, 显著高于对照组的 22.98%, 说明线粒体移植对小鼠卵母细胞发育能力具有提高作用^[78]。Yi 等报道, 分别对年轻和老龄小鼠行 MIT, 与对照组相比, 年轻小鼠组两者囊胚率差异显著, 老龄小鼠组两者囊胚率差异极显著^[79]。在黄牛, 王晓磊等尝试对黄牛卵母细胞行 MIT 后进行孤雌激活, 结果 MIT 组的桑椹胚率显著高于对照组^[80]。上述表明, 将一定数量的外源线粒体注入卵母细胞内, 可以增加卵母细胞 ATP 的含量, 且移植的线粒体具有一定的可持续活性, 可以一定程度改善卵母细胞的质量和胚胎发育能力。

在卵母细胞发育过程中, 其周围裹有大量的颗粒细胞, 随着卵母细胞的生长, 两者之间的作用也越来越紧密。通过细胞间形成的特殊“间隙连接”, 颗粒细胞为卵母细胞提供小分子能量物质和调节因子, 同时卵母细胞又对颗粒细胞的增殖和分化起着重要的调控作用。颗粒细胞与卵母细胞的相互作用和特殊关系, 使得两者的线粒体在形态和功能方面有较大的相似性。因此, 在 MIT 的研究中, 人们普遍以颗粒细胞线粒体来进行移植, 二者线粒体的相似性使得颗粒细胞线粒体易与受体内源性线粒体一道接受分化调节, 并且颗粒细胞获得方便, 易培养, 可为线粒体的提取提供充足的细胞来源。

本试验以水牛卵泡颗粒细胞作为线粒体的来源细胞, 尝试对水牛卵母细胞进行线粒体移植, 通过研究线粒体移植对胚胎的发育及线粒体膜电位的影响, 探讨线粒体移植对水牛卵母细胞发育潜能的影响以及其在水牛卵母细胞上应用的可行性, 以期提高水牛卵母细胞的质量和胚胎的发育能力, 加快良种水牛繁育速度。

第一章 水牛卵泡颗粒细胞的体外分离培养及筛选

摘要 本研究旨在建立水牛卵泡颗粒细胞的体外培养模型,为后续试验中提取线粒体提供充足的来源细胞。试验主要通过分析体外分离获得的卵泡颗粒细胞的活率、原代培养效果,以及体外培养条件下细胞的增殖及凋亡情况,并对颗粒细胞培养基进行筛选,从而初步了解水牛卵泡颗粒细胞体外生长特性;同时比较体外培养不同代数颗粒细胞的凋亡率、染色体整倍体比率以及提取的线粒体活性等指标,筛选出适宜用于提取线粒体的颗粒细胞培养代数。结果发现:分离获得的水牛卵巢颗粒细胞存活率为 60%左右,体外培养、传代效果良好;采用 DMEM 培养基,颗粒细胞的生长速度和生长状态优于 TCM-199 和 DMEMF12 培养基;颗粒细胞培养 24 h 后开始零星增殖,3~5 d 增殖速度达到高峰;第 1、3、5、7 代颗粒细胞染色体整倍体比率差异不显著,均在 85%以上;第 1 代颗粒细胞的凋亡率与第 5 代差异显著 ($P<0.05$),与第 7 代差异极显著 ($P<0.01$);另外随着颗粒细胞培养代数的增加,提取的线粒体活性呈下降趋势。结果表明:DMEM 培养基较适宜用于水牛颗粒细胞的体外培养;水牛颗粒细胞能稳定地进行传代培养,且在一定代数范围内,染色体的整倍体性没有发生明显改变;但随着培养代数的增加,细胞凋亡率会明显升高,提取的线粒体活性呈下降趋势,故线粒体提取应采用培养第 1~3 代的卵泡颗粒细胞。

关键词: 水牛 卵泡颗粒细胞 原代培养 培养基 线粒体 增殖 凋亡

随着哺乳动物卵母细胞体外成熟培养技术的逐渐成熟,颗粒细胞对卵母细胞的营养和调节作用也越来越受到人们的重视,颗粒细胞不仅为卵母细胞提供生长所需的特异性因子,同时其还参与调节生长期卵母细胞特异性蛋白的合成和蛋白质磷酸化的类型^[86]。在卵母细胞体外成熟培养中,Eppig 等报道在成熟液中添加颗粒细胞有助于小鼠卵母细胞的成熟^[87]。同样这种方法也在人和牛等哺乳动物卵母细胞体外成熟培养中获得成功,并且明显提高了卵母细胞的成熟率和受精率,尤其是对裸卵^[88,89]。因此,颗粒细胞在卵母细胞的体外成熟培养过程中有着无可替代的作用,通过体外培养下颗粒细胞分泌、增殖和凋亡等机制的研究,可以进一步了解卵母细胞和颗粒细胞之间的相互作用。同时颗粒细胞也是研究动物卵巢内分泌功能以及生殖毒理学的一种理想细胞模型^[90]。因此,建立水牛卵泡颗粒细胞体外培养体系,对于研究水牛卵母细胞成熟机制以及卵巢内分泌功

能有着重要的作用；在本试验中，建立水牛颗粒细胞培养体系可为线粒体的提取提供充足的来源细胞。目前关于哺乳动物颗粒细胞的体外分离培养多见人、小鼠、大鼠、猪等^[90-92]，但关水牛颗粒细胞体外培养的报道较少，且大多数培养的水牛颗粒细胞是取自卵母细胞外周的卵丘颗粒细胞，尚无明确标准的卵泡颗粒细胞原代培养方法。鉴于此，本试验通过优化水牛卵泡颗粒细胞分离培养方法，比较不同培养基（DMEM、TCM-199、DMEMF12）对水牛颗粒细胞生长状态的影响以筛选出适宜水牛颗粒细胞的培养基，并对细胞的增殖及凋亡进行检测，了解水牛卵巢颗粒细胞体外生长特性，从而建立水牛卵泡颗粒细胞分离培养体系。另外，颗粒细胞线粒体的活性和功能受颗粒细胞的生长状态、凋亡及染色体异常等因素的影响，通过对这几项指标的比较，初步筛选出适宜提取线粒体的颗粒细胞体外培养代数，为后续线粒体的提取提供参考依据。

1. 材料与方法

1.1 实验材料

水牛卵巢采自于南宁市屠宰场，将水牛卵巢置于 30℃左右高压灭菌生理盐水中 2~3 h 内运回实验室。

1.2 主要仪器及试剂

1.2.1 主要仪器

- 超净工作台：苏州佳德净化科技
- CO₂ 培养箱：美国，Heras
- 实体显微镜：日本，Nikon
- 高速冷冻离心机：美国，Sigma
- 荧光显微镜：日本，Nikon
- 低速离心机：北京医用离心机厂
- 移液枪：德国，Eppendorf
- 培养皿：丹麦，Nunc
- Milli-Q 水制备机：法国，Millipore
- 石英亚沸高纯水蒸馏器：江苏宜兴

1.2.2 主要试剂

TCM-199、DMEMF12、青链霉素、丙酮酸钠购自 Gibco 公司, 其他主要试剂购自美国 Sigma 公司。Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、BrdU 细胞增殖检测试剂盒、4%台盼蓝溶液为碧云天生物试剂, 线粒体提取试剂盒, hermo 公司。

PBS 磷酸缓冲液: 0.2g KCl, 8g NaCl, 1.44g Na_2HPO_4 , 0.2g NaH_2PO_4 , 加入三蒸水中溶解, 定容至 1000ml, 加入 10%青链霉素 (100 $\times$), 调节 pH: 7.2~7.4, 0.22 μm 滤器过滤, 4 $^\circ\text{C}$ 保存。

DMEM 培养液: 13.4g DMEM 粉剂、0.055g 丙酮酸钠、2.2g NaHCO_3 , 加入三蒸水中溶解, 定容至 1000ml。pH 调节至 7.0~7.2, 0.22 μm 滤器过滤, 4 $^\circ\text{C}$ 保存。使用前添加 10% FBS 和青链霉素 (100 $\times$)。

0.25%胰蛋白酶消化液 (Trypsin): 6.7g NaCl、0.3g KCl、2.5g NaHCO_3 、2.5g Trypsin、0.4g EDTA、0.055g 丙酮酸钠、1g D-葡萄糖、加入三蒸水中溶解, 定容至 1000ml, 调节 pH 至 7.6~7.8 之间, 0.22 μm 滤器过滤, 4 $^\circ\text{C}$ 保存。

秋水仙素: 将 0.01g 秋水仙素, 加入 10ml 三蒸水溶解, 即浓度为 1mg/mL 母液, 使用时需要将其稀释至浓度为 0.2 $\mu\text{g/mL}$ 。

Gimasa 染色液: 将 2ml Gimasa 原液加入 48ml 超纯水混匀。

低渗液: 将 0.025g KCl, 0.02g 枸橼酸钠, 加入 10ml 三蒸水中溶解, 注意现配现用。

固定液: 将甲醇和醋酸按体积比 3:1 混合, 现配现用。

CCM 液 (即洗卵液): 9.5g TCM-199 粉剂, 0.4g NaHCO_3 , 0.9g NaCl, 1.2g Hepes, 0.06g 青霉素, 0.1g 链霉素, 20~30 ml FBS, 加入三蒸水中溶解, 定容至 1000ml, pH 调节至 7.2~7.4, 0.22 μm 滤器过滤, 4 $^\circ\text{C}$ 保存。

4%多聚甲醛: 将 4g 多聚甲醛加入 100ml PBS 磷酸缓冲液溶解, 可在 60~65 $^\circ\text{C}$ 下助溶, 调节 pH 至 7.0~7.2, 4 $^\circ\text{C}$ 保存。

1% Triton X-100: 将 1ml Triton X-100 与 99ml PBS 磷酸缓冲液混匀即可, 4 $^\circ\text{C}$ 保存。

阻断液: 将 0.75g glycine、0.3g BSA, 加入 PBS 磷酸缓冲液溶解后定容至 100ml, 4 $^\circ\text{C}$ 保存。

1% BSA: 将 1.0g BSA, 加入 PBS 磷酸缓冲液溶解后定容至 100ml, 4 $^\circ\text{C}$ 保存。

1.3 方法

1.3.1 水牛卵巢颗粒细胞的分离与原代培养

从屠宰场收集的水牛卵巢置于 30℃左右高压灭菌生理盐水中 2~3h 运回实验室。卵巢先用 75%酒精润洗消毒后，再用预热灭菌生理盐水清洗 2~3 遍，移到超净工作台内 37℃恒温加热板上，用带有 12 号针头的 10mL 注射器先吸取少量预热 CCM 液后，将针头水平刺入卵巢皮质层上直径为 2~5mm 的卵泡内抽取卵泡液。抽出的卵泡液置于灭菌的玻璃离心管中 38℃静置 5min，取上清液进行离心（1500 r/min，5min），弃上清。向沉淀中加入 500μl 0.25%胰酶溶液轻吹混匀，置于培养箱中消化 3~5min 后加入等体积含 10%FBS 的 DMEM 培养基终止消化。38℃静置 5min，取上清液离心（1500 r/min，5min），弃上清，颗粒细胞沉淀留在管底。加入适量预热 DMEM 培养基清洗沉淀，用 400 目灭菌细胞筛过滤，回收液体再次离心（1500 r/min，5min），弃上清。最后用含 10% FBS 的 DMEM 培养基稀释细胞至 1×10^6 个/mL，接种于一次性细胞培养皿中，放入 38℃、5% CO₂ 和饱和湿度培养箱中培养。24h 后，对原代培养细胞进行清洗，待细胞汇合至 80%左右进行传代培养。

1.3.2 卵巢颗粒细胞的活率测定

取少量上述接种前细胞悬液置于灭菌 EP 管中，加入等量的 4%台盼蓝溶液染色混匀，30s 后取少量悬液滴于载玻片上，覆以盖玻片，低倍镜下观察计数蓝染细胞数量。蓝染细胞为死细胞，透明未染色的细胞为活细胞（图 1-1）。

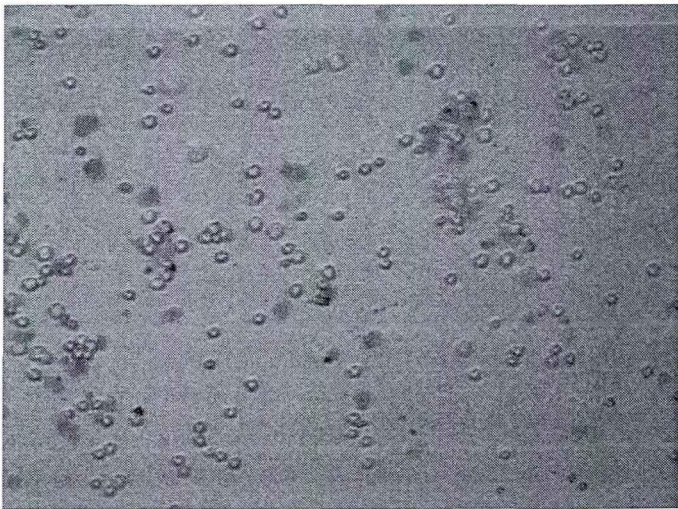


图 1-1 台盼蓝染色
Fig.1-1 The staining of trypan blue

1.3.3 不同培养基的筛选

目前文献上有关哺乳动物颗粒细胞体外培养使用的培养基多为以下三种：DMEM、TCM-199 和 DMEMF12 培养基。不同物种颗粒细胞对培养基的适应性不同，哪种培养基更适于水牛颗粒细胞的体外培养，本试验对此进行了筛选。

1.3.3.1 原代贴壁效果 将分离获得的颗粒细胞分别用 DMEM、TCM-199 和 DMEMF12 三种培养基进行原代培养，显微镜下分别观察三组细胞在 0~48h 内贴壁和生长状况，每 12h 观察一次。

1.3.3.2 细胞生长速度 将上述三组原代培养的细胞分别进行传代培养，调整颗粒细胞浓度至 2×10^5 个/mL 后接种于 12 孔板内，每组接种 4 孔。细胞计数板分别计数 12h、24h、36h 和 48h 后各组的细胞数。

1.3.3.3 细胞生长状态 分别用 DMEM、TCM-199 和 DMEMF12 三种培养基对颗粒细胞进行长期传代培养，显微镜观察比较三组第 1~7 代细胞的生长状态。

1.3.4 卵巢颗粒细胞的增殖检测

第 2 代水牛卵巢颗粒细胞， 5×10^4 个/mL 接种于 24 孔板，每 24h 处理 3 孔，检测颗粒细胞的增殖情况。染色前 24h 添加 BrdU 0.3mg/mL 到培养液中孵育 24h，次日加入 4% 多聚甲醛固定 30min，阻断液清洗 2 次。1%Trionx-100 透化 30 min，阻断液清洗 2 次。再用 4mol/L 盐酸变性 30min，TBSA 清洗 2 次。然后用 1% BSA 封闭 1h，2 μ g/mL 鼠抗 BrdU 单克隆抗体 4℃孵育过夜，次日用羊抗小鼠的二抗（1:200）孵育 90min，TBSA 清洗 2 次，用荧光显微镜进行观察拍照。

1.3.5 卵巢颗粒细胞的凋亡检测

Annexin V-FITC 和 PI 双染法检测卵巢颗粒细胞的凋亡情况。分别收集 P1、P3、P5 和 P7 代卵巢颗粒细胞，按照试剂盒说明书方法进行测定。凋亡的颗粒细胞会被 Annexin V-FITC 染色，细胞边缘呈现绿色荧光，坏死细胞会被 PI 染色而呈现红色荧光。用荧光显微镜观察记录视野内凋亡细胞的数目，常光下记录视野内细胞总数，计数 20 个视野，计算细胞的凋亡率。

1.3.6 卵巢颗粒细胞的核型分析

分别收集 P1、P3、P5 和 P7 代卵巢颗粒细胞进行核型分析。待细胞汇合至 70~80% 时，向培养液中加入 0.25 μ g/mL 的秋水仙素，继续培养 3~4 h 后收集细胞。经离心（1500

r/min, 5min) 后, 去掉上清液, 加入预热 (37 °C) 的 0.075mol/L 的 KCl 溶液低渗处理 30min; 然后, 直接加入 1mL 新配制的 (醋酸: 甲醇=1: 3) 固定液, 终止低渗并进行预固定 1~2min, 离心 (1500 r/min, 5min) 后去掉上清液, 再加入固定液 3~5mL, 用吸管轻轻吹打, 使细胞团分散成单个细胞, 室温固定 20min, 重复固定 3 次。固定结束后取细胞悬液于 50cm 高度垂直滴于冰冻载玻片, 待其自然晾干后用 Giemsa 染液 (0.9%Giemsa 原液: 0.1mol/L PBS=1: 9) 染色 15min, 流水背面冲洗, 自然干燥。高倍镜下观察计数染色体数目。

1.3.7 线粒体的提取及活性检测

分别收集 P1、P3、P5 和 P7 代水牛颗粒细胞, 提取线粒体 (线粒体提取试剂盒, Thermo 公司)。待细胞汇合至 70~80% 时, 消化收集足量细胞 (5×10^7), 洗涤后加入预冷的 2ml 玻璃匀浆器中, 加入 800 μ l 分离液 A, 冰上研磨 30~40 次使细胞破裂 (可取少量研磨液镜下观察细胞破裂程度), 加入 500 μ l 分离液 C 并一起转移到灭菌 EP 管内, 1500 r/min 5min, 取上清 12000 r/min 20min, 弃上清, 加入 500 μ l 分离液 C 重悬洗涤, 1500 r/min 5min, 取上清 12000 r/min 10min, 线粒体沉淀在管底, 可 4 °C 短暂保存。活性线粒体经 Mito-Tracker Green 染色后可以发出绿色荧光, 活性较低或失去活性的线粒体则荧光强度较弱或没有荧光。检测时, 加入线粒体 Mito-Tracker 荧光探针工作液 200 μ l 混匀, 培养箱内孵育 30min, PBS 洗涤后 12000 r/min 10min 回收线粒体, 荧光显微镜下观察不同代数颗粒细胞提取的线粒体荧光强度。

1.4 统计分析

试验所得结果用统计软件 spss19.0 进行分析, 差异显著标准为 $P < 0.05$, 差异极显著标准为 $P < 0.01$ 。

2 结果与分析

2.1 水牛颗粒细胞的活率及原代培养

采用胰酶短时间消化, 并结合 400 目细胞筛过滤的方法分离的卵泡颗粒细胞, 经台盼蓝染色测得其活率约为 62%, 使用 DMEM 培养基体外原代培养效果良好。原代培养 24h 后 (图 1-2 A B), 清洗去死细胞和组织碎片、杂质后, 生长状态良好, 待细胞汇合度达到 70%~80% 后, 可进行细胞传代, 培养效果良好。

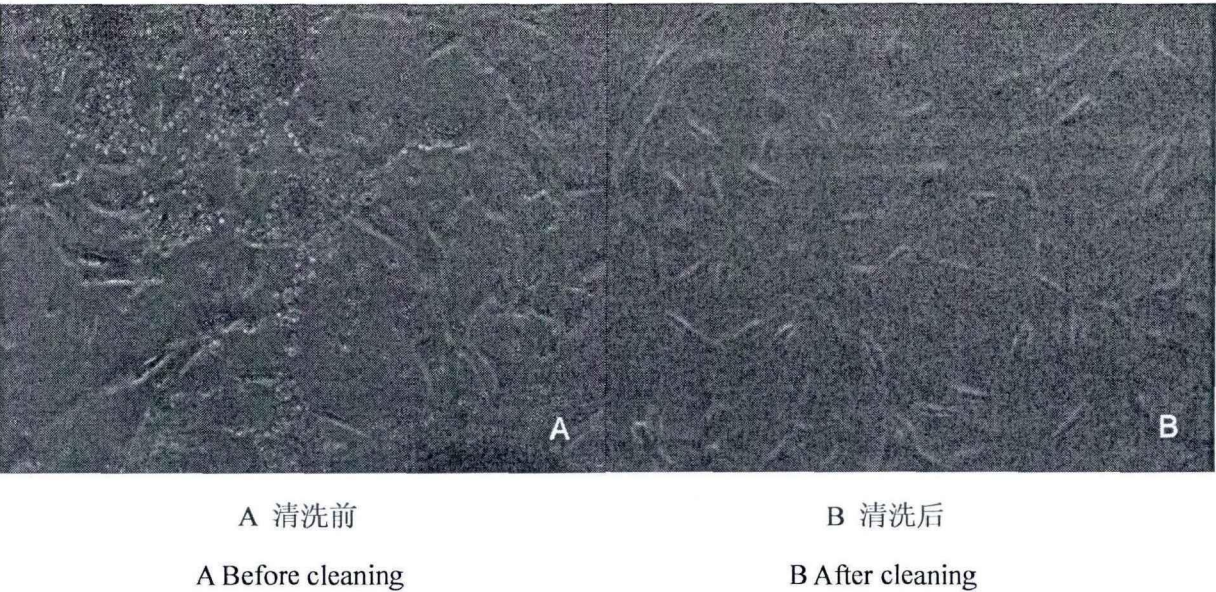


图 1-2 清洗前后的原代培养 24h 的颗粒细胞（100×）

Fig.1-2 Before and after cleaning of granulosa cells primary cultured for 24h (100×)

2.2 水牛颗粒细胞培养基的筛选

从三组颗粒细胞原代培养 0~48h 内的贴壁效果看，使用 TCM-199 和 DMEM 培养基原代贴壁效果明显优于 DMEMF12 培养基。原代培养 48h 后，TCM-199 组与 DMEM 组颗粒细胞生长密度相近，两组都明显大于 DMEMF12 组。从细胞生长速度来看（如表 1-1 所示），第一代颗粒细胞体外培养 24h 和 36h 后，DMEM 组的细胞密度显著大于 TCM-199 组和 DMEMF12 组（ $P<0.05$ ）；体外培养 48h 后，DMEM 组的细胞密度极显著大于 TCM-199 组和 DMEMF12 组（ $P<0.01$ ）。从细胞形态来看，随着培养时间和代数的增加，TCM-199 组和 DMEMF12 组细胞都会有一定程度的胞质颜色加深、细胞扁平、产生空泡 立体感差等现象；而 DMEM 培养基则可以相对较好的维持颗粒细胞的生长状态，使细胞胞质较透亮、立体感强、伪足丰富、排列紧密。说明 DMEM 培养基更适合水牛卵巢颗粒细胞的体外培养。

表 1-1：不同培养基对水牛颗粒细胞生长速度的影响

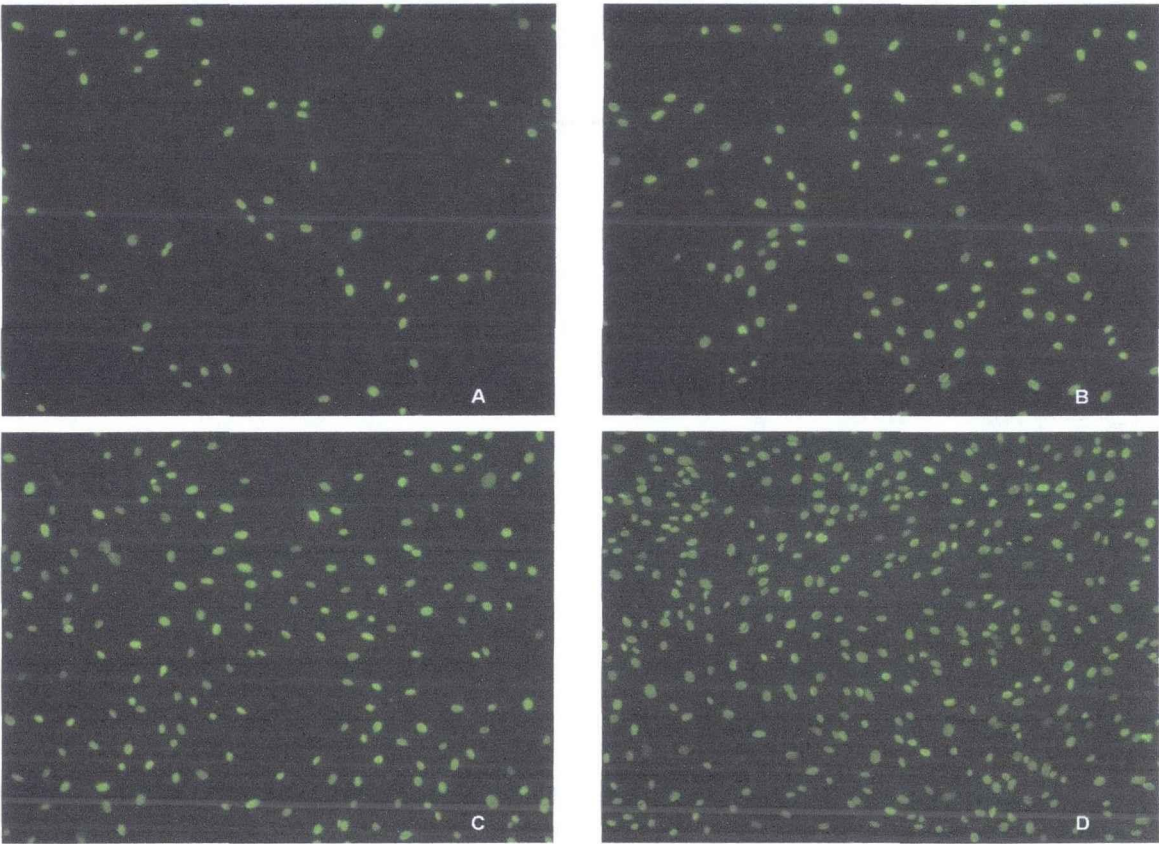
Table.1-1: The effect of the different culture medium on growth rate of buffalo granulosa cells

组别 Groups	细胞密度($\times 10^5$)		Cell density($\times 10^5$)	
	12 h	24 h	36 h	48 h
DMEM	2.23±0.11	2.97±0.27 ^a	3.82±0.08 ^a	5.06±0.20 ^A
TCM -199	2.27±0.19	2.69±0.17 ^b	3.31±0.12 ^b	4.45±0.14 ^B
DMEM/F12	2.18±0.09	2.61±0.23 ^b	3.29±0.26 ^b	4.19±0.12 ^B

注：同列标注不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),不同大写字母表示差异极显著 ($P<0.01$)。
Note: data with different small letters in the same column mean significant difference ($P<0.05$), different capital letters indicate highly significant difference ($P<0.01$).

2.3 水牛颗粒细胞的增殖检测

在动物细胞增殖过程中，BrdU 可以代替胸腺嘧啶参与核酸的合成，通过 BrdU 抗体可以检测细胞中 BrdU 的分布。在荧光显微镜下，可以看到处于增殖阶段的细胞发出绿色荧光，从而得出样品细胞的增殖情况。试验对第 2 代水牛卵泡颗粒细胞体外培养不同阶段的增殖情况进行测定发现，体外培养 24h 细胞开始进入有丝分裂期，但是只处于零星增殖阶段（图 1-3 A），第 2 天细胞增殖开始增多（图 1-3 B），第 3 天细胞增殖速度明显加快（图 1-3 C），到第 5 天细胞增殖达到成倍增长的速度（图 1-3 D）。可见，颗粒细胞体外培养第 3~5 天增殖速度达到最快，此时细胞处于对数生长阶段。



A、B、C、D 依次是 24 h、2 d、3 d 和 5 d（100×）

A, B, C, D is 24 h, 2 d, 3 d and 5 d in turn (100×)

图 1-3 水牛卵巢颗粒细胞的 BrdU 标记

Fig.1-3 The BrdU markers of buffalo ovarian granulosa cells

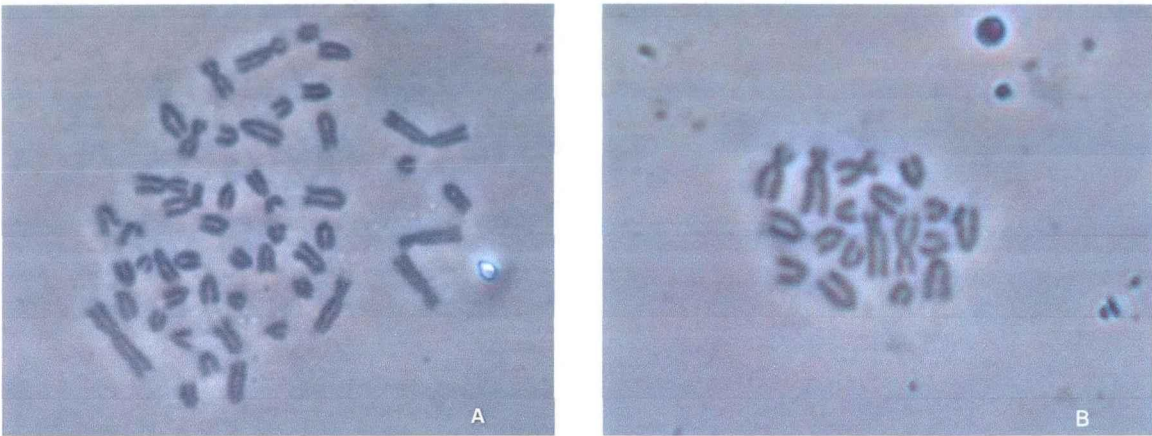
2.4 水牛颗粒细胞的核型分析

分别对 P1、P3、P5 和 P7 代水牛卵巢颗粒细胞进行染色体倍性检测。在视野下随即选取 100 个左右分裂中期细胞，统计其染色体整二倍体（2n=48，图 1-4 A）、非正二倍体（2n≠48，图 1-4 B）比率，其结果如下表 1-2 所示。各代颗粒细胞染色体整二倍体性比率均在 85%以上，无显著差异（P>0.05）。说明水牛卵巢颗粒细胞在体外培养的过程中，在一定代数内，染色体整倍体性没有随着传代培养发生明显的改变，细胞核型相对稳定。

表 1-2：不同代数卵巢颗粒细胞整二倍体核型比率

Table.1-2: The diploid karyotype ratio of ovarian granulosa cell of different generations

细胞代数	重复数/次	整二倍体核型率(%)
Cell batches	Repeat number/time	The diploid karyotype rate (%)
P1	3	87.22±2.55
P3	3	88.89±2.55
P5	3	87.78±0.96
P7	3	85.56±2.51



A 整二倍体染色体

B 非整二倍体染色体

A The euploid chromosome

B the aneuploid chromosome

图 1-4 水牛卵巢颗粒细胞的核型检测（400×）

Fig.1-4 Karyotype detection of buffalo ovarian granulosa cells (400×)

2.5 水牛颗粒细胞的凋亡检测

凋亡细胞的边缘会被 Annexin V-FITC 探针附着呈现绿色荧光（图 1-5 A），荧光显微镜下观察统计细胞凋亡率，其结果如表 1-3 所示。P1 代颗粒细胞的凋亡率为（7.67±0.23）%，与 P3 代颗粒细胞的凋亡率（7.62±0.36）%差异不显著，但与 P5 代颗

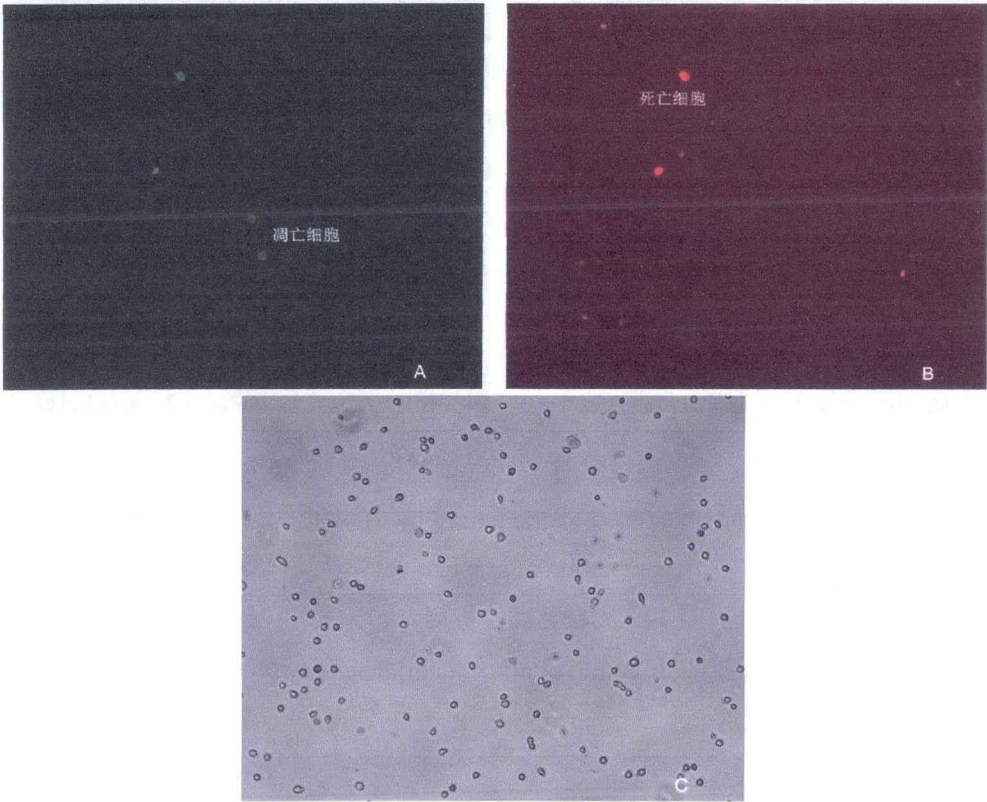
粒细胞的凋亡率(8.26 ± 0.19)%差异显著($P<0.05$),与 P7 代颗粒细胞的凋亡率(9.35 ± 0.47)%差异极显著 ($P< 0.01$)。说明水牛卵巢颗粒细胞体外培养时,在一定代数范围内,细胞发生凋亡的比率会随着培养时间和传代次数的增加而升高。

表 1-3: 不同代数卵巢颗粒细胞凋亡率

Table.1-3: The apoptosis rate of ovarian granulosa cells of different generations

细胞代数	重复数/次	凋亡率(%)
Cell generations	Repeat number/time	Apoptosis rate(%)
P1	3	7.67 ± 0.23^{Aa}
P3	3	7.62 ± 0.36^{Aa}
P5	3	8.26 ± 0.19^{Ab}
P7	3	9.35 ± 0.47^{Bc}

注：同列标注不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),不同大写字母表示差异极显著 ($P<0.01$)。
Note: data with different small letters in the same column mean significant difference ($P<0.05$), different capital letters indicate highly significant difference ($P<0.01$).



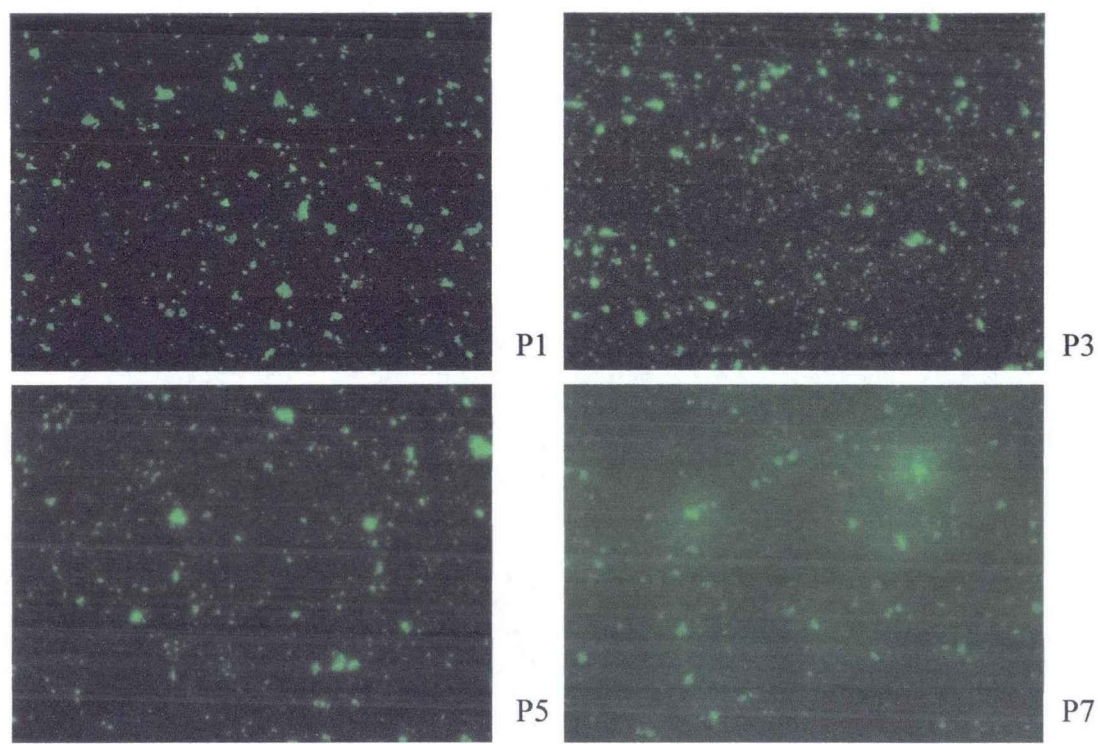
A、B、C 分别是：Annexin V-FITC 染凋亡的颗粒细胞，PI 染死亡的颗粒细胞和常光下的颗粒细胞。
A, B, C respectively are: the apoptotic granulosa cells dyed by AnnexinV-FITC, the death granular cells dyed by PI and granulosa cells under the light.

图 1-5 水牛卵巢颗粒细胞的凋亡检测（100×）

Fig.1-5 Apoptosis detection of buffalo ovarian granulosa cells (100×)

2.6 线粒体的提取及活性检测

分别收集 P1、P3、P5 和 P7 代水牛颗粒细胞，参照线粒体提取试剂盒（Thermo 公司）说明书，提取线粒体并用线粒体 Mito-Tracker Green 活性荧光探针标记，具有良好活性的线粒体呈绿色荧光，活性较低或失去活性的线粒体则荧光强度较弱或没有荧光。结果显示，随着颗粒细胞体外培养代数的增加，提取的线粒体活性呈下降趋势，如图 1-6 所示。



P1、P3、P5、P7 分别为第 1、3、5、7 代颗粒细胞提取线粒体的 Mito-Tracker 标记。
P1, P3, P5, P7 respectively are the mitochondria tagged by Mito-Tracker extracted from 1, 3, 5, 7 generation of granular cells.

图 1-6 线粒体活性检测（400×）
Fig.1-6 The detection of mitochondrial activity (400×)

3 讨论

目前，在卵母细胞体外成熟培养中添加颗粒细胞已经成为一种常识。研究表明：该方法在一定程度上可以明显提高小鼠、大鼠、人等卵母细胞的体外成熟效果和后期胚胎的发育能力^[88]。Leibfried 等认为该方法可能模拟了卵母细胞体内最终成熟时与颗粒细胞间的相互作用，暂时抑制了减数分裂的复始^[93, 94]。但加入的颗粒细胞浓度和凋亡状况也会影响到卵母细胞的成熟效果，细胞浓度过大或是凋亡率过高不但不会刺激卵母细胞的

成熟分裂的复始,还会起到一定的抑制作用^[95]。本试验在测定卵巢颗粒细胞的凋亡时发现,颗粒细胞的凋亡率会随着培养时间和培养代数的增加而显著升高,因此向成熟液中加入颗粒细胞或者使用颗粒细胞作滋养层时,应尽可能选用培养早期的颗粒细胞。

另外颗粒细胞可作为研究水牛卵巢生理功能的一种理想细胞模型。颗粒细胞是卵泡中最大的细胞群,在维持和调节卵巢生殖机能中发挥重要的作用。为了更好的了解卵巢的生理功能,很多学者选择以卵巢颗粒细胞为研究对象,通过对体外培养基中添加甾体激素和各种因子来探讨其对体外培养颗粒细胞的增殖及凋亡作用。试验发现,体外培养的水牛卵巢颗粒细胞在培养 24 h 时处于零星增殖,生长速度缓慢,在培养第 3~5 d 时细胞生长旺盛,处于增殖高峰,因此开展此类实验时应多选择在这一期间进行,以确保细胞在整个试验过程中都处于对数生长期。

试验中分离出的颗粒细胞活率为 60%左右,低于文献中其他物种的相关报道^[91, 92],说明水牛较其他物种卵泡内颗粒细胞的死亡率更高,这也可能是造成水牛卵母细胞体外成熟效果不如其他物种原因之一。为了保证细胞存活率并获得较高纯度的卵巢颗粒细胞,试验不经过红细胞裂解液处理,只用胰酶进行短时间消化,并结合 400 目细胞筛进行过滤。短时间的胰酶消化可以更好将颗粒细胞从一些组织或杂质上脱离下来,但不会对细胞造成太大损伤,400 目细胞筛可以进一步滤除杂质;另外由于红细胞不贴壁,只需在培养 24~48 h 后对细胞进行清洗换液,便可获得较高纯度的颗粒细胞。不同物种的颗粒细胞对培养基的要求也不同,本试验在比较不同培养基对颗粒细胞体外培养效果的影响时发现,使用 TCM-199 和 DMEM 培养基的原代贴壁效果明显优于使用 DMEMF12 培养基,但随着培养时间和传代次数的增加,使用 TCM-199 培养基的颗粒细胞状态会发生明显的下降,细胞变得扁平,缺乏立体感,并且胞质颜色加深,而 DMEM 培养基则能更好的维持细胞在体外培养条件下的生长状态和生长速度。因此,本研究中颗粒细胞培养基均采用 DMEM 培养基。

动物细胞在体外培养中,其细胞染色体整倍体性会受到外部因素的影响而发生改变。本试验对体外培养的第 1、3、5、7 代水牛颗粒细胞的染色体整倍体性检测发现,随着培养代数的增加,其染色体整倍体比率呈下降趋势,但差异不显著。说明在体外培养一定代数范围内,水牛颗粒细胞的染色体整倍体性没有随着培养代数的增加发生明显改变。但对不同培养代数颗粒细胞的凋亡率以及不同培养代数颗粒细胞提取的线粒体活性检测发现,随着水牛颗粒细胞体外培养代数的增加,其线粒体的活性会逐渐下降,细胞凋亡率明显升高,这也可能是由于体外培养环境一定程度加剧了颗粒细胞衰老凋亡的

速度, 进而导致线粒体的活性下降。因此综合以上试验结果, 本研究主要以第 1~3 代水牛颗粒细胞作为提取线粒体的来源细胞。

4 结论

4.1 DMEM 培养基较适宜用于水牛颗粒细胞的体外培养。

4.2 水牛卵泡颗粒细胞在体外培养的过程中, 一定代数范围内, 染色体整倍体性没有随着传代培养发生明显的改变, 但随着培养代数的增加, 细胞凋亡率会明显升高, 而线粒体活性呈下降趋势, 故线粒体提取应采用培养 1~3 代的水牛卵泡颗粒细胞。

第二章 水牛卵母细胞质量及发育潜能与线粒体拷贝数的关系

摘要 本试验采用实时荧光定量 PCR 技术分别检测体外成熟不同质量（级别）水牛卵母细胞 mtDNA 的拷贝数，同时结合各级别卵母细胞孤雌激活胚胎的发育率，旨在研究体外成熟培养的水牛卵母细胞质量、发育潜能与线粒体拷贝数之间的关系，为后续水牛卵母细胞线粒体移植的研究提供参考依据。结果显示，一级卵母细胞组的平均 mtDNA 拷贝数极显著高于二、三级卵母细胞组（ 202101 ± 74432 vs 118483 ± 17028 , 39177 ± 7938 , $P<0.01$ ）；二级卵母细胞组的平均 mtDNA 拷贝数极显著高于三级卵母细胞组（ 118483 ± 17028 vs 39177 ± 7938 , $P<0.01$ ）；对不同级别的水牛卵母细胞进行孤雌激活后，发现一级卵母细胞组胚胎的卵裂率和囊胚率都极显著高于二、三级卵母细胞组（ $P<0.01$ ）；二级卵母细胞组胚胎的卵裂率和囊胚率都极显著高于三级卵母细胞组（ $P<0.01$ ）。结果表明，不同质量的水牛卵母细胞的 mtDNA 拷贝数存在显著差异；水牛卵母细胞的 mtDNA 拷贝数与卵母细胞质量和胚胎的发育能力成正相关。

关键词： 水牛 卵母细胞 mtDNA 拷贝数 荧光定量 孤雌激活

线粒体中含有的 DNA（mtDNA），是一种独立于核 DNA 之外的遗传物质，可以进行自我复制和转录，同时编码多个基因和蛋白多肽。由于这些生产 ATP 的重要蛋白和酶类是由核基因和 mtDNA 协同编码的，所以 mtDNA 对于卵母细胞的成熟和随后的胚胎发育能力有着重要的影响。同时由于 mtDNA 基因多为单拷贝基因，所以 mtDNA 拷贝数可以一定程度指代线粒体的含量，从而评估卵母细胞成熟质量和发育潜能。研究表明，随着卵母细胞的成熟完成，mtDNA 将不再进行自我复制，直至囊胚孵化阶段才恢复复制，因此，早期胚胎发育各阶段所需要的能量则主要由卵母细胞自身所携带的有限的线粒体提供^[84]。如果卵母细胞内含有的线粒体数目不足，mtDNA 突变或缺失，则会导致纺锤体形成障碍、染色体不分离、新陈代谢无法顺利进行等，进而导致胚胎发育异常或停滞^[16, 18, 19]。

本试验通过将体外成熟培养后的水牛卵母细胞按质量级别分类，通过实时荧光定量 PCR 技术分别对其 mtDNA 拷贝数进行定量检测，同时将各组细胞进行孤雌激活处理，观察胚胎的发育情况，从而探讨水牛卵母细胞质量、发育潜能与线粒体含量之间的关系，为后续水牛卵母细胞线粒体移植试验提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

水牛卵巢采自于南宁市屠宰场，将水牛卵巢置于 30℃ 左右高压灭菌生理盐水中 2~3 h 内运回实验室。

1.2 主要仪器及试剂

1.2.1 主要仪器

电泳仪和凝胶成像系统： 美国 BIO-RAD

PCR 扩增仪： 德国 Biometra

紫外分光光度计： 德国 Therm

生化恒温培养箱： 上海博迅医疗设备

7500 Real Time PCR： 美国 Applied Biosystems

其余仪器同第一章。

1.2.2 主要试剂

本试验所用生物及化学试剂非特殊说明外均购自 Sigma 公司。质粒 PMD18-T Vector、DNA taq 酶、10×PCR Buffer、Taq Mastermix 和 SYBR Premix Ex Taq™ 购自大连宝生物公司 (TaKaRa)，质粒提取试剂盒和 DNA 胶回收试剂盒 (TianGEN)，Agarose 琼脂糖购自上海北诺生物科技有限公司，卵母细胞裂解液 (ells-to-cDNA™ II Kit) 购自英国 Huntingdon 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 水牛卵母细胞的采集和成熟培养

从屠宰场收集的水牛卵巢置于 30℃ 左右高压灭菌生理盐水中 2~3h 运回实验室。卵巢先用 75% 酒精润洗消毒后，再用预热灭菌生理盐水清洗 2~3 遍，移到超净工作台内 37℃ 恒温加热板上，用带有 12 号针头的 10mL 注射器先吸取少量预热 CCM 液后，将针头水平刺入卵巢皮质层上直径为 2~5mm 的卵泡内抽取卵泡液。在体式显微镜下，从卵泡液中拣出卵母细胞进行体外成熟培养。

体外成熟培养时，先将卵母细胞在预热成熟培养液中清洗 2~3 遍后，再放入新鲜

预热的成熟液中，每 100μl 体积成熟液中约放入 20~30 枚水牛 COCs。之后置于 38.5 ℃、5% CO₂、饱和湿度的恒温培养箱中成熟培养 22~24h。

1.3.2 体外成熟卵母细胞的分类

根据体外成熟后卵母细胞的形态和卵丘颗粒细胞层的数量，可将卵母细胞大致分为 5 类^[96]：A 类卵母细胞形态规则，卵丘颗粒细胞致密，至少包裹有 5 层以上卵丘颗粒细胞；B 类卵母细胞形态基本规则，卵丘颗粒细胞为 2~4 层，基本上包裹卵母细胞；C 类卵母细胞大部分被卵丘颗粒细胞包裹，形态基本规则；D 类卵母细胞外只有少量卵丘颗粒细胞存在，形态基本规则；E 类卵母细胞为裸卵，形态基本规则。其中 A、B 类卵母细胞归为一级（图 2-1 A），C、D 类卵母细胞归为二级（图 2-1 B），E 类卵母细胞归为三级（图 2-1 C）。

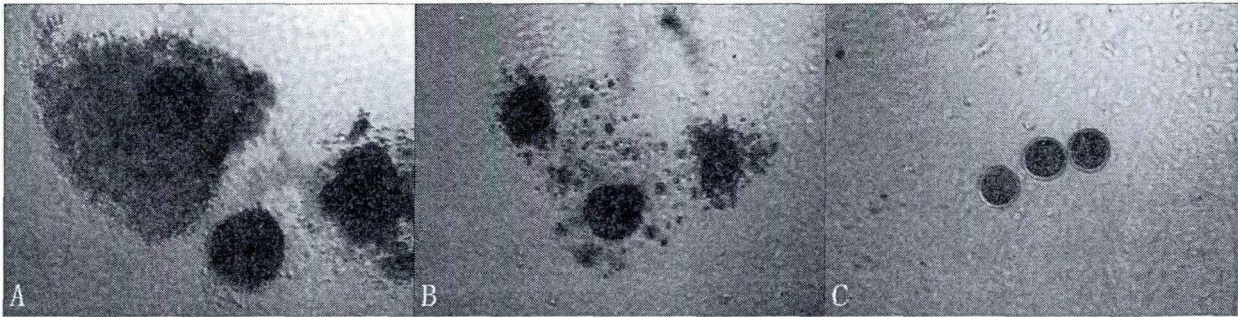


图 2-1 A、B、C 依次是体外成熟的一、二、三级水牛卵母细胞（100×）

Fig.2-1 A, B, C are the grade-one, two, three of buffalo oocytes in vitro maturation in turn (100×)

1.3.3 PCR 模板的制备和引物设计

将 5 枚水牛卵母细胞移入 10μl 体积卵母细胞裂解液中，先在 55℃水浴锅内放置 20~30min，然后在 100℃沸水中放置 5min，再以 1000 r/min 离心 2min，取 5μl 上清液稀释 10 倍后作为 PCR 模板。参考 Genbank 中牛线粒体全基因组（NC_006853）和华松等文献内容报道^[97]，设计引物序列（上游：5'-CAGTGAGAATGCCCTCTAGG-3'；下游：5'-TTTACGCCGTACTCCTGT-3'）。

1.3.4 标准品的制备

1.3.4.1 PCR 扩增

在 200μl 灭菌 PCR 中依次加入 Taq Mastermix 10μl、引物各 0.5μl、模板 1μl、双蒸水 8μl，首次 95℃变性 3min，接着 95℃变性 30s，58℃退火 30s，72℃延伸 30s，循环 30 次，最后 72℃延伸 10min。扩增后产物点样电泳（110 V，40min），凝胶成像分析系

统拍照观察。

1.3.4.2 目的片段的克隆及鉴定

按照 DNA 胶回收试剂盒 (TianGEN) 说明书, 回收并纯化 PCR 产物, 利用 pMD18-T 载体进行连接。在 200 μ l 灭菌 PCR 中依次加入 Solution I 4.6 μ l、纯化的 PCR 产物 5 μ l、超纯水 6 μ l、pMD18-T 载体 0.4 μ l, 于 16 $^{\circ}$ C 水浴过夜, 次日进行转化。转化前先将复苏液和培养基放入 37 $^{\circ}$ C 生化培养箱中平衡 1h, 后从 -80 $^{\circ}$ C 中取出感受态细菌置于冰上融化。取 5 μ l 连接产物加入感受态细菌中冰浴 30min, 后将混合物放入 42 $^{\circ}$ C 水浴锅水浴 60s, 冰上放置 2min。加入 1mL 复苏液于混合物中, 摇床中混匀 45min 后离心。弃去上层 800 μ l 液体, 将剩余液体混匀涂于加入抗生素的 LB 固体培养上, 37 $^{\circ}$ C 培养 12h 后挑菌、摇菌。提取质粒前先进行菌液 cracking 鉴定, 挑选阳性菌液提取质粒 (TianGEN 质粒提取试剂盒)。测定质粒浓度, 稀释保存, 并对重组质粒进行双酶切鉴定, 从质粒上下游载体上选择合适酶切位点, 切下目的片段。

1.3.4.3 荧光定量 PCR

将上述梯度稀释好的质粒作为模板, 进行荧光定量 PCR 扩增, 制备标准曲线。反应体系为: SYBR II 10 μ l、ROX 染料 0.4 μ l、引物各 0.3 μ l、双蒸水 8 μ l、模板 1 μ l, 共 20 μ l; 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 5min, 95 $^{\circ}$ C 30s, 60 $^{\circ}$ C 1min, 循环 45 次。最后根据已知质粒浓度计算 mtDNA 的拷贝数, 作为实时荧光定量标准品。

1.3.5 孤雌激活

按照上述水牛卵母细胞分级, 分别对各组卵母细胞进行孤雌激活。先用 5 μ mol/L 的离子霉素 (Ion) 激活处理 5min, 清洗 3 遍, 然后移入含 2mmol/L 的二甲氨基嘌呤 (6-DMAP) 的培养液中激活处理 3~4h。激活处理后清洗 3 遍, 移入水牛颗粒细胞单层的培养微滴内, 置于 38.5 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度的恒温培养箱中进行培养, 隔天换液一次。24h 后统计各组胚胎卵裂率, 7d 后统计各组胚胎囊胚发育率。

1.3.6 mtDNA 拷贝数检测

收集体外成熟后各组水牛卵母细胞和各组孤雌激活后分裂、未分裂卵母细胞, 5 枚一组放入 10 μ l 体积细胞裂解液内, 55 $^{\circ}$ C 水浴锅内放置 20~30min, 100 $^{\circ}$ C 沸水中放置 5min, 再以 1000 r/min 离心 2min, 最后取 10 μ l 上清液稀释 20 倍后作为 PCR 模板。荧光定量 PCR 反应体系同上, 以双蒸水和裂解液作为阴性对照组。

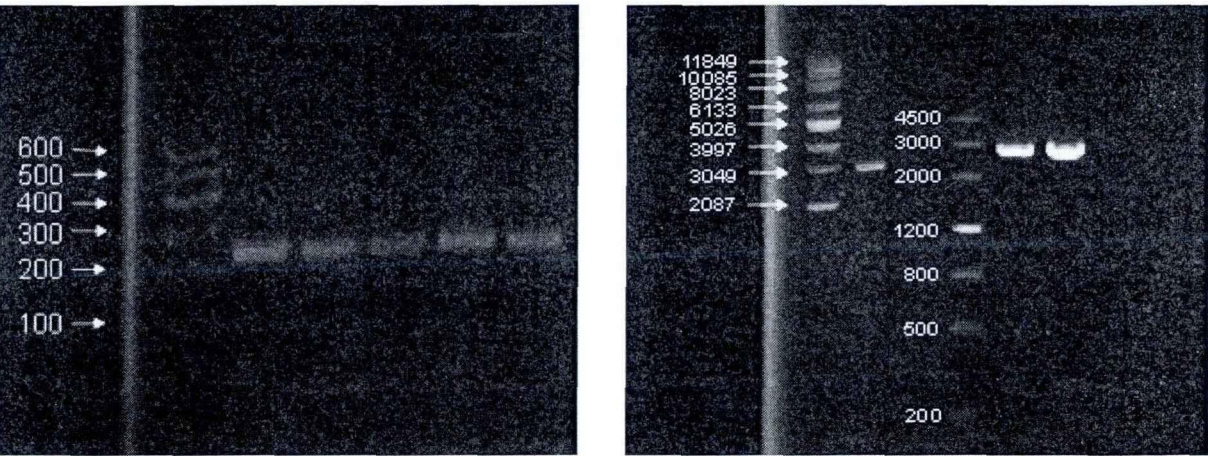
1.4 统计分析

试验所得结果用统计软件 spss19.0 进行 X^2 检验和 t 检验进行分析，差异显著标准为 $P<0.05$ ，差异极显著标准为 $P<0.01$ 。

2 结果与分析

2.1 标准品的制备

PCR 产物经 1%凝胶电泳检测，扩增出 225bp 大小目的片段（图 2-2 A），扩增条带清洗明亮，没有拖带现象。重组质粒经双酶切鉴定如下图 2-2 B 所示：左侧为 super marker 对照，重组质粒大小约 3000bp，条带清晰明亮，右侧为双酶切检测（marker III），切下片段为 300bp 左右，与预期结果一致，说明质粒构建成功。



A PCR 扩增目的基因片段

B 重组质粒的双酶切鉴定

A The target gene fragment of PCR amplification

B Double digestion of the recombinant plasmid

图 2-2 目的片段扩增及双酶切鉴定电泳图

Fig.2-2 The electrophoresis map of propagate target fragment and double digestion detection

将梯度稀释的质粒经 QRT-PCR 反应后，得到的标准曲线如下图 2-3 所示。标准曲线的斜率为-3.396，截距为 36.492，R2 值为 0.997，其线性范围可达 6 个数量级，其重组质粒浓度与相应的 Ct 值线性关系良好，可用于量化样品中 mtDNA 的拷贝数。

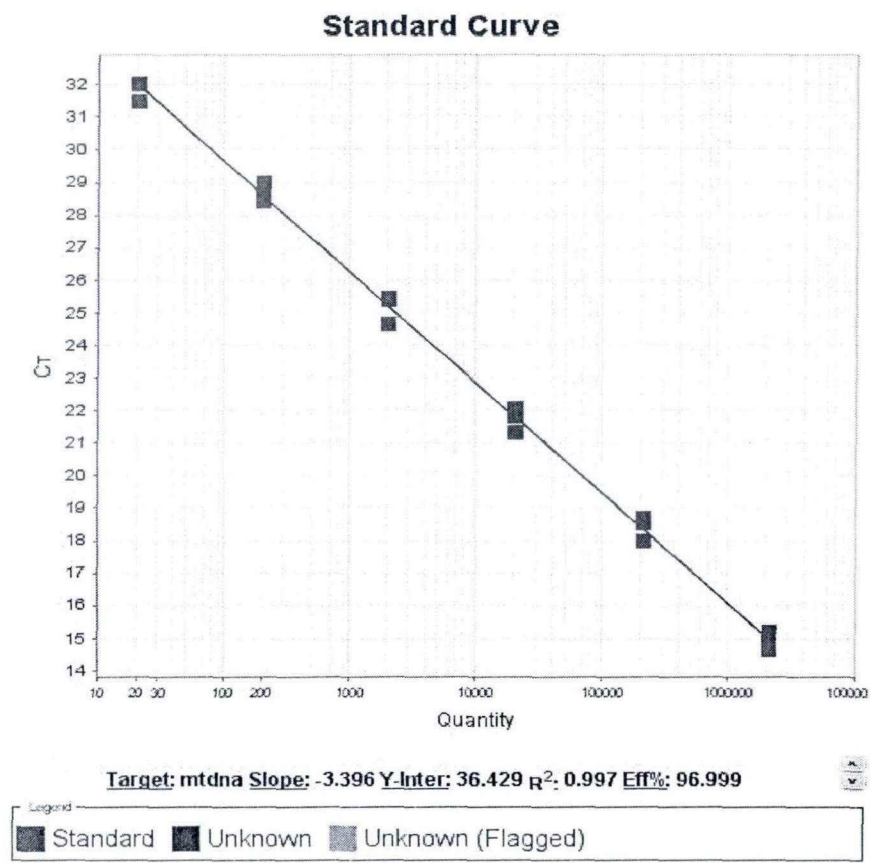


图 2-3 mtDNA 拷贝数的标准曲线
Fig.2-3 The standard curve of mtDNA copy number

2.2 不同质量水牛卵母细胞的 mtDNA 拷贝数

收集体外成熟后各级别水牛卵母细胞分别进行 mtDNA 拷贝数的定量分析，其结果如下表 2-2 所示：一级卵母细胞组的平均 mtDNA 拷贝数极显著高于二、三级卵母细胞组（202101±74432 vs 108483±17028，39177±7938，P<0.01）；二级卵母细胞组的平均 mtDNA 拷贝数极显著高于三级卵母细胞组（108483±17028 vs 39177±7938，P<0.01）。说明不同质量的水牛卵母细胞的 mtDNA 拷贝数存在显著差异。

表 2-1 不同质量水牛卵母细胞 mtDNA 的平均拷贝数

Table 2-1The average copy number of mtDNA of different quality of buffalo oocytes			
组别	一级卵母细胞	二级卵母细胞	三级卵母细胞
Groups	grade one oocytes	grade two oocytes	grade three oocytes
mtDNA 拷贝数	202101±74432 ^A	118483±17028 ^B	39177±7938 ^C
mtDNA copy number			

注：同行标注不同大写字母表示差异极显著（P<0.01）。

Note: data with different capital letters in the same line indicate highly significant difference ($P<0.01$).

2.3 不同级别水牛卵母细胞孤雌激活胚胎的发育

将不同级别水牛卵母细胞进行孤雌激活处理，观察各组胚胎发育情况，其结果如下表 2-1 所示。从结果可以看出：一级卵母细胞组激活后胚胎的卵裂率和囊胚率都极显著高于二、三级卵母细胞组 ($P<0.01$)；二级卵母细胞组激活后胚胎的卵裂率和囊胚率都极显著高于三级卵母细胞组 ($P<0.01$)。说明水牛卵母细胞的 mtDNA 拷贝数与卵母细胞质量和胚胎发育的能力成正相关（图 2-4）

表 2-2 不同质量水牛卵母细胞孤雌激活胚胎的发育情况

Table.2-1 The development of parthenogenetic embryos from different quality of buffalo oocytes

组别	卵母细胞数	分裂率 (%)	囊胚率 (%)
Groups	Oocytes(Num)	Cleavage rate (%)	The blastocyst rate (%)
一级	117	71.83±2.60 ^A	42.85±2.86 ^A
二级	143	41.61±5.52 ^B	25.06±2.04 ^B
三级	129	15.26±1.41 ^C	2.25±0.79 ^C

注：同列标注不同大写字母表示差异极显著 ($P<0.01$)。

Note: data with different capital letters in the same column are highly significant difference ($P<0.01$).

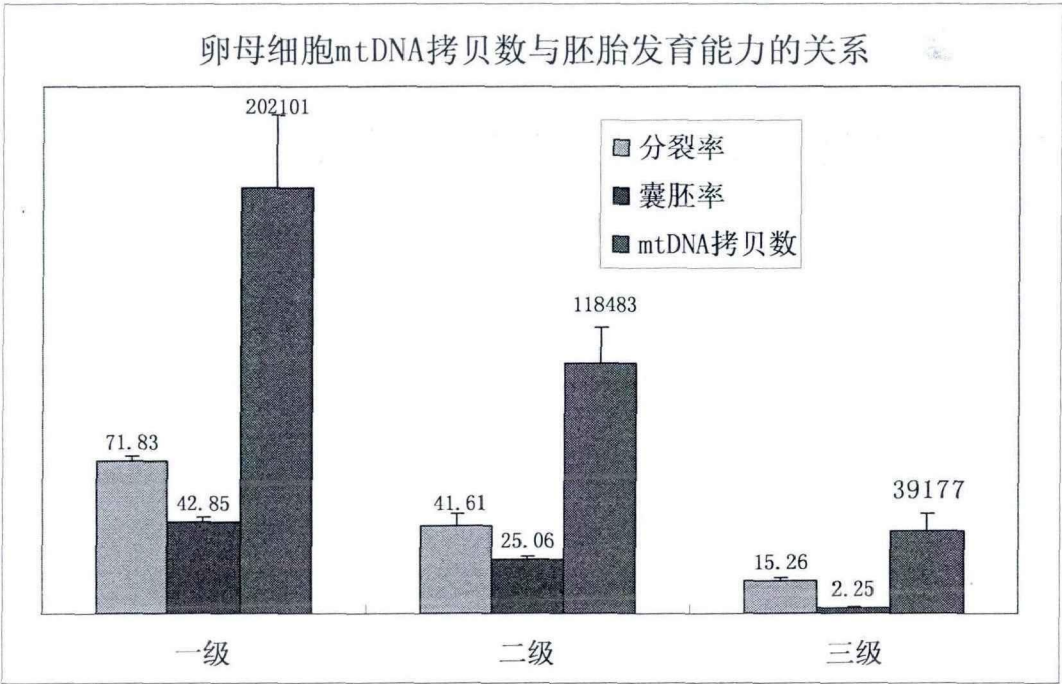


图 2-4 卵母细胞 mtDNA 拷贝数与胚胎发育能力的关系

Fig.2-4 The relationship between oocyte mtDNA copy number and embryo development

3 讨论

mtDNA 拷贝数是影响哺乳动物卵母细胞成熟质量和早期胚胎发育能力的重要因素。在卵母细胞成熟的过程中,细胞内的 mtDNA 不断进行复制,线粒体的数量和分布也会随着卵母细胞成熟过程中对能量的需求变化而变化。细胞成熟后 mtDNA 复制停止,直到囊胚孵化阶段才逐渐恢复复制。试验中发现三级水牛卵母细胞的 mtDNA 拷贝数极显著低于一、二级卵母细胞组,说明三级水牛卵母细胞(裸卵)在体外成熟过程中未能正常进行 mtDNA 复制,细胞成熟不完全,同时说明了卵丘颗粒细胞对卵母细胞的成熟有着至关重要的作用。由于在胚胎的早期发育过程中,线粒体不进行自我复制,其早期胚胎发育各阶段所需要的能量则由卵母细胞成熟后自身所携带的有限的线粒体完成,因此,卵母细胞内 mtDNA 的数量和线粒体功能状态直接影响到胚胎的发育能力。如试验结果所示,水牛卵母细胞的 mtDNA 拷贝数与卵母细胞质量和胚胎发育的能力成正相关。因此,线粒体 mtDNA 拷贝数的多少可以一定程度上作为评估水牛卵母细胞成熟质量和随后胚胎发育能力的指标。

哺乳动物卵母细胞是含有 mtDNA 最多的细胞,约含有几千到几十万不等的 mtDNA 拷贝。多项研究表明卵母细胞内 mtDNA 拷贝数在种间和种内都存在较大差异的变化,Chen 等报道人的成熟卵母细胞内约为 138000 个^[50],而 Reynier^[98]和 Steuerwald^[99]报道的则分别为 193000 和 314000 个。在鼠中,Steuerwald 等^[99]报道成熟卵母细胞含有的 mtDNA 平均拷贝数为 160000; Tamassia 等则报道牛的卵母细胞 mtDNA 拷贝数约为 370000,而本试验结果显示水牛卵母细胞的 mtDNA 平均拷贝数约为 150000 个,这可能与物种及试验方法差异有关。尽管卵母细胞间 mtDNA 拷贝数变化相当大,但 Spikings 等^[100]报道正常卵母细胞内 mtDNA 的拷贝数有一个阈值,卵母细胞所含的 mtDNA 拷贝数低于相应的阈值就不能正常发育。在本研究随后的线粒体移植试验中发现,给质量差的卵母细胞注射一定量的线粒体,可以使其细胞内 mtDNA 总数达到这个阈值,从而显著提高了胚胎发育效果,这也说明了 mtDNA 拷贝数是衡量卵母细胞成熟质量和早期胚胎发育能力的标准之一。

4 结论

- 4.1 不同质量的水牛卵母细胞的 mtDNA 拷贝数存在显著差异。
- 4.2 水牛卵母细胞的 mtDNA 拷贝数与卵母细胞质量和胚胎的发育能力成正相关。

第三章 颗粒细胞线粒体移植对水牛卵母细胞的影响

摘要 本试验以水牛颗粒细胞为线粒体来源细胞，对水牛卵母细胞进行线粒体移植，通过观察卵母细胞 MIT 后外源线粒体在胚胎发育过程的分布情况，并分析其对早期胚胎的发育和线粒体膜电位的影响，探讨 MIT 对改善水牛卵母细胞发育潜能的可行性。结果显示：线粒体（Mito-Tracker 荧光探针标记）移植后，线粒体会随着胚胎发育而发生移动，至桑椹胚期仍有部分细胞可以观察到荧光，但随着胚胎的发育荧光强度会逐渐消弱；卵母细胞行 MIT 后进行孤雌激活处理，二级卵母细胞 MIT 组的囊胚率显著高于对照组和空注组（27.3% VS 17.4%，7.84%），三级卵母细胞 MIT 组的囊胚率与对照组和空注组无显著差异（4.73% VS 3.43%，1.36%）；对植入前胚胎线粒体膜电位分析显示，从 2-细胞期至囊胚期胚胎的 $\Delta\Psi_m$ 总体呈上升趋势，MIT 组 2-细胞、4-细胞期胚胎的 $\Delta\Psi_m$ 极显著高于对照组（ $P<0.01$ ），8-细胞期、桑椹胚期和囊胚期 $\Delta\Psi_m$ 显著高于对照组（ $P<0.05$ ）。

以上结果表明：（1）外源线粒体移植后，在一定时间内，可持续具有活性并参与了早期胚胎发育的过程；（2）颗粒细胞线粒体移植可以一定程度上提高水牛二级卵母细胞的发育潜能，但对三级卵母细胞的发育潜能无明显促进作用；（3）颗粒细胞线粒体移植可以明显提高水牛植入前各时期胚胎的 $\Delta\Psi_m$ 值。

关键词 线粒体移植 线粒体膜电位 水牛 颗粒细胞 孤雌激活

水牛是我国南方重要的家畜，但其繁殖力低下，种群的生产性能低劣。本实验室长期研究发现，水牛卵母细胞体外成熟质量和胚胎发育能力远不如黄牛，如何提高水牛卵母细胞质量对于加快良种水牛繁育速度有着重要的作用。线粒体是参与细胞内氧化供能和凋亡调节的一种重要的细胞器，其对早期胚胎的发育起着重要的作用。研究发现，线粒体移植可以一定程度改善卵子质量并为胚胎的早期发育补充必要的能量。目前已在人、大鼠和小鼠等物种上得到证实，且已有经线粒体移植的婴儿和部分动物的诞生^[76-80]，但线粒体移植是否对水牛卵母细胞的发育潜能有促进作用尚未见报道。本试验旨在研究颗粒细胞线粒体移植在水牛卵母细胞上应用的可行性，探讨其对水牛卵母细胞发育潜能及早期胚胎线粒体膜电位的影响，

1. 材料与方法

1.1 实验材料

水牛卵巢采自于南宁市屠宰场,将水牛卵巢置于30℃左右高压灭菌生理盐水中2~3h内运回实验室。

1.2 主要仪器及试剂

1.2.1 主要仪器

实体显微镜: 日本, Nikon

倒置显微镜及显微操作系统: 日本, Nikon

激光扫描共聚焦显微镜: 德国, LSM510 meta, Leica

其余仪器同第一章、第二章。

1.2.2 主要试剂

线粒体提取试剂盒, 德国 Hermo 公司; Mito-Tracker Green 线粒体荧光探针, 碧云天生物公司; JC-1 线粒体荧光探针, 美国 AAT Bioquest; 其他化学试剂均购自 Sigma 公司。

成熟液 (Mature Medium, M 液): TCM199 粉剂 + 5.0mmol/L Hepes + 5%胎牛血清 (FBS) + 26.2mmol/L NaHCO₃ + 0.1μg/mL FSH + 60 mg/L 青霉素 + 100mg/L 链霉素

胚胎培养液 (Culture Medium, CM 液): TCM199 粉剂 + 5.0mmol/L Hepes + 3% FBS + 26.2mmol/L NaHCO₃ + 60mg/L 青霉素 + 100mg/L 链霉素

细胞操作液 (MCB): 5ug /ml 细胞松弛素 B (CB) 加入 CCM 液。

其余试剂同第一章、第二章。

1.3 试验方法

1.3.1 提取线粒体

待颗粒细胞汇合至 70~80% 时, 胰酶消化、收集细胞, 单次提取的细胞数约 5×10^7 。依据线粒体提取试剂盒说明书操作要求 (Thermo 公司), 将收集的颗粒细胞洗涤后加入预冷的 2ml 玻璃匀浆器中, 加入 800μl 分离液 A, 冰上研磨 30~40 使细胞破裂 (可取少

量研磨液镜下观察细胞破裂程度),加入 500 μ l 分离液 C 并一起转移到灭菌 EP 管内,1500 r/min 5min,取上清 12000 r/min 20min,弃上清,加入 500 μ l 分离液 C 重悬洗涤,1500 r/min 5min,取上清 12000 r/min 10min,弃上清,线粒体沉淀在管底,加入 5 μ l CM 液混匀悬浮备用。

1.3.2 卵母细胞的体外成熟培养

水牛卵巢经清洗消毒后移入抽卵室超净工作内,置于 38℃ 恒温加热板上,用带有 12 号针头的 10ml 注射器抽取卵巢皮质层 2~5mm 直径的卵泡。抽卵前先吸取少量预热的 CCM 液,将抽取的混合液放入经高温灭菌的玻璃培养皿中静置片刻,实体显微镜下收集水牛卵丘-卵母细胞复合体(COCs)。经 CCM 液清洗 2~3 遍后,放于预热 M 液中过渡处理 3min,之后移入另一份 M 液中成熟培养,每毫升 M 液中放入 100~150 个 COCs,置于 38.5℃、5% CO₂ 和饱和湿度的 CO₂ 培养箱中进行体外成熟培养,成熟培养时间为 22~24 h 后。

1.3.3 培养用颗粒细胞单层的制备

将成熟培养后的卵母细胞用 200 μ l 微量移液枪轻轻吹打至卵丘颗粒细胞脱落,收集卵母细胞备用。除去脱落在成熟液中的块状细胞团和不溶杂质并轻轻吹打,使卵丘颗粒细胞以单个细胞形式均匀悬浮在成熟液中,用 CM 液洗涤并调整细胞密度约为 1×10^6 /ml,用微量移液器在 60 $\times$ 15mm 一次性无菌培养皿中做成 25 μ l 的液滴,并覆盖培养用石蜡油,置于 CO₂ 培养箱中培养,待颗粒细胞贴壁生长后用 CM 液清洗死亡颗粒细胞后即可使用。培养用颗粒细胞单层隔天换液一次,可使用多次,待颗粒细胞生长状态明显下降时,需制备新的颗粒细胞单层。

1.3.4 线粒体移植

在制备显微操作盘前,应将事先提取好的线粒体放入 CO₂ 培养箱中温育 30min。在 60 $\times$ 15mm 一次性无菌培养皿中做 5 μ l 线粒体悬液滴、10 μ l 操作液(MCB)滴、10 μ l 胰酶溶液滴,覆盖石蜡油,CO₂ 培养箱中温育 5~10min。将卵母细胞放入操作液滴,借助显微操作系统,使用内径约为 7 μ m 显微注射针,每次吸取线粒体悬液(相当于 1~1.5 个卵母细胞直径长度)缓缓注入单个卵母细胞内(图 3-1: A B)。线粒体移植后用 CM 液清洗 2~3 次,置于 CO₂ 培养箱内恢复处理 1h 后进行孤雌激活处理。

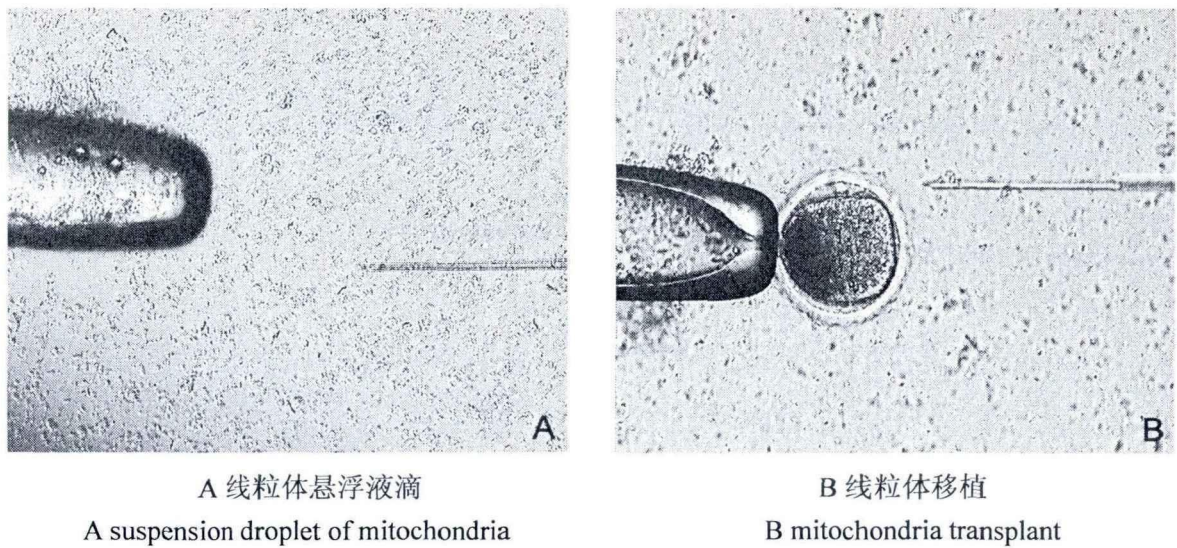


图 3-1 线粒体移植 (100×)

Fig 3-1 mitochondrial transplant (100×)

1.3.5 卵母细胞孤雌激活处理

卵母细胞孤雌激活处理主要采用化学激活法。处理前要预先平衡 CM 液、离子霉素激活液、6-二甲氨基嘌呤（6-DMAP）激活液。将卵母细胞置于 CM 液清洗 2~3 遍后移入离子霉素（Ion）激活液中处理 5min（置于 CO₂ 培养箱内），收集卵母细胞，用 CM 液清洗 2~3 遍后移入 6-DMAP 激活液中处理 3~4h（置于 CO₂ 培养箱内）。激活处理结束后收集卵母细胞再次用 CM 液清洗 2~3 次，移入颗粒细胞单层培养盘中培养。

1.3.6 胚胎线粒体膜电位(ΔΨ_m)测定

按照线粒体膜电位检测试剂盒说明书配制 JC-1 工作液，染色前先将工作液在 CO₂ 培养箱中温育 30min，使用时与 CM 培养液 1:1 混匀。收集各时期胚胎在 CM 液中洗涤 2~3 遍后，移入 JC-1 工作液中置于 CO₂ 培养箱中染色 30min。由于 JC-1 探针的水溶性较差，会有轻微絮状不容物附在胚胎表面，染色结束后需用 CM 液多次洗涤，可轻微吹打。荧光显微镜下分别于绿色和红色荧光模块下观察，获取荧光图像，使用 Image-Pro Plus 6.0 软件测量同一胚胎的红、绿荧光值，最后计算同一胚胎的红、绿荧光比值即为胚胎的线粒体膜电位值（ΔΨ_m）。

1.4 试验设计

1.4.1 线粒体移植后的追踪观察

将提取的活性颗粒细胞线粒体用 Mito-Tracker 荧光探针标记后，借助显微操作系统，

适量注入体外成熟培养 24h 后的到水牛卵母细胞内，并进行孤雌激活处理后。荧光显微镜下观察随着胚胎的发育，外源线粒体的分布及存活情况。

1.4.2 线粒体移植对水牛胚胎发育的影响

本试验旨在研究水牛卵母细胞线粒体移植的可行性。结合第二章实验结果及实验材料等因素，试验主要以孤雌激活处理作为胚胎发育类型，初步探讨 MIT 对二、三级卵母细胞发育潜能的影响。将提取的活性线粒体移植到二、三级卵母细胞后进行孤雌激活处理，设置空注组(移入等量的线粒体悬浮液)和对照组（不移植），观察并统计各组胚胎发育情况。

1.4.3 线粒体移植对水牛胚胎线粒体膜电位的影响

本试验旨在探索 MIT 对水牛植入前胚胎线粒体膜电位的影响。收集体外成熟培养 24h 后的水牛二级卵母细胞，随机分为两组，一组进行线粒体移植，另一组为对照组，然后分别进行孤雌激活处理并进行胚胎培养。分别收集两组各时胚胎，JC-1 荧光染料染色，荧光显微镜下拍照并统计分析两组各时期胚胎的 $\Delta\Psi_m$ 值

1.5 统计分析

试验所得结果用统计软件 spss19.0 进行分析，差异显著标准为 $P<0.05$ ，差异极显著标准为 $P<0.01$ 。

2 结果与分析

2.1 线粒体移植后的追踪观察

颗粒细胞线粒体经 Mito-Tracker 荧光探针标记后呈绿色荧光，可通过荧光显微镜观察随着胚胎的发育，外源线粒体的分布及存活情况。但由于植入线粒体的数量有限（约 3000~5000 个）以及荧光淬灭等因素的影响，胚胎荧光强度相对较弱。结果显示（图片说明：图 5），线粒体会随着胚胎发育而发生移动，并被分配到卵裂球中，至桑椹胚期部分细胞仍可以观察到微弱荧光。说明颗粒细胞线粒体移植后，在一定时间内，持续具有活性并参与了早期胚胎发育的过程。

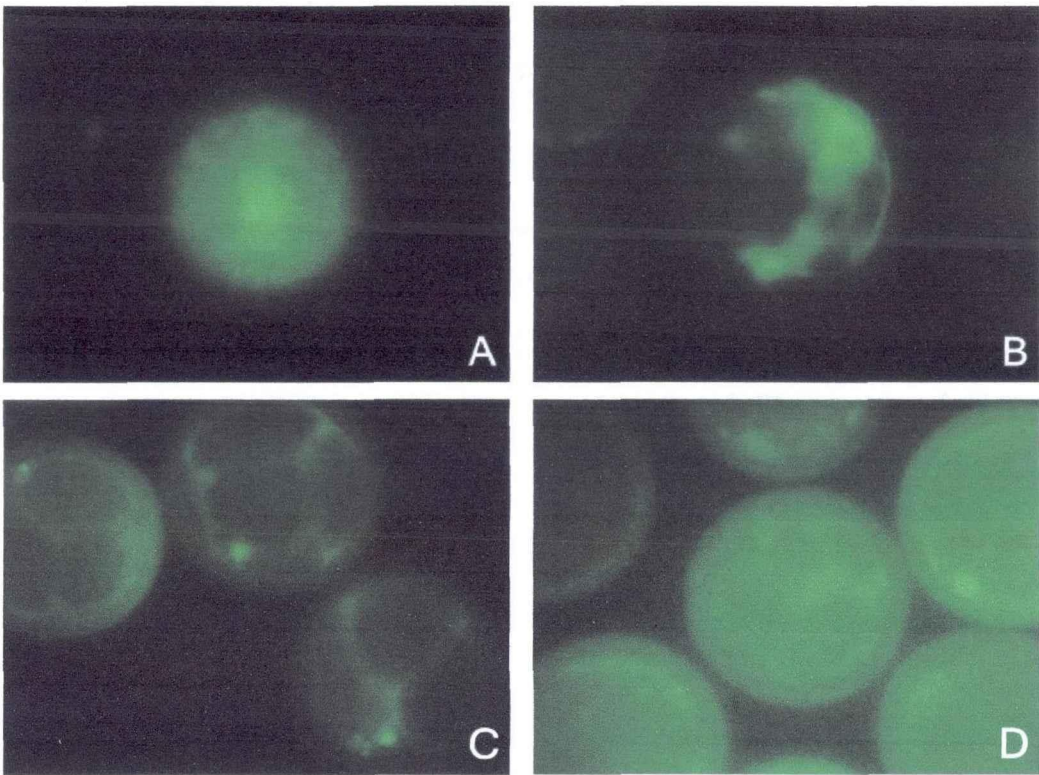


图 3-2. 线粒体移植后各时期胚胎的荧光观察（400×）

Fig 3-2.The fluorecence observing of embryos in different stage after Mitochondria transplant (400×)

注：A, B, C, D 依次为线粒体注射后 2h、2-细胞期、4-细胞期和桑椹胚期的胚胎

Note:A, B, C, D respectively are the embryos after mitochondria injection for 2 h, 2 - cell stage, 4 - cell stage and morula stage

2.2 线粒体移植对水牛胚胎发育的影响

本试验主要研究了线粒体移植对二、三级水牛卵母细胞孤雌激活胚胎发育率的影响。结果发现（表 3-1、3-2）：二级卵母细胞线粒体移植组的囊胚率显著高于对照组和空注组（27.3% vs 17.4%， 7.84%），三级卵母细胞线粒体移植组的囊胚率与对照组和空注组无显著差异（4.73% vs 3.43%， 1.36%）。说明水牛颗粒细胞线粒体移植可以一定程度改善卵母细胞孤雌激活胚胎的发育潜能，但对与三级卵母细胞孤雌激活胚胎的发育无明显作用。

表 3-1 MIT 对水牛二级卵母细胞孤雌激活胚胎发育的影响

Table.3-1 The effect of MIT on parthenogenetic embryonic development of buffalo grade two oocytes

组别	细胞数	卵裂数	8-细胞胚胎数	囊胚数
Groups	Number of oocytes	Cleavage number	8-cell embryo number	The blastocyst number
注射组	143	84(58.7%) ^{aA}	70(48.9%) ^{aA}	39(27.3%) ^{aA}
对照组	115	71(61.8%) ^{aA}	45(39.1%) ^{bA}	20(17.4%) ^{bA}
空注组	102	42(41.2%) ^{bB}	19(18.6%) ^{cB}	8(7.84%) ^{cB}

注：同列标注不同小写字母表示差异显著(P<0.05)，不同大写字母表示差异极显著（P<0.01）。

Note: The data with different small letters in the same column mean significant difference (P<0.05), different capital letters indicate highly significant difference (P<0.01).

表 3-2 MIT 对三级水牛卵母细胞孤雌激活胚胎发育的影响

Table.3-2 The effect of MIT on parthenogenetic embryonic development of buffalo grade three oocytes

组别	细胞数	卵裂数	8-细胞胚胎数	囊胚数
Groups	Number of oocytes	Cleavage number	8-cell embryo number	The blastocyst number
注射组	169	31(18.3%) ^a	20(11.8%) ^a	8(4.73%)
对照组	175	34(19.4%) ^a	19(10.9%) ^a	6(3.43%)
空注组	147	13(8.84%) ^b	7(4.76%) ^b	2(1.36%)

注：同列标注不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。

Note: data with different small letters in the same column mean significant difference (P<0.05).

2.3 线粒体移植对水牛胚胎线粒体膜电位的影响

线粒体膜电位 $\Delta\Psi_m$ 是在线粒体内膜两侧离子泵的作用下形成的，是保证线粒体电子传递链和氧化磷酸化形成的前提，从而保证了 ATP 的正常供应。本试验主要通过 JC-1 荧光探针染色来检测不同时期胚胎的 $\Delta\Psi_m$ 值，荧光显微镜下分别于绿色和红色荧光模块下观察，获取荧光图像（图片说明：图 1），使用 Image-Pro Plus 6.0 软件测量同一胚胎的红、绿荧光值，最后计算同一胚胎的红、绿荧光比值即为胚胎的线粒体膜电位值（ $\Delta\Psi_m$ ），分析线粒体移植组对水牛早期胚胎线粒体膜电位的影响，其结果如下表 3-5 所示：从 2-细胞期至囊胚期胚胎的 $\Delta\Psi_m$ 总体呈上升趋势，MIT 组 2-细胞、4-细胞期胚胎的 $\Delta\Psi_m$ 极显著高于对照组（P<0.01），8-细胞期、桑椹胚期和囊胚期 $\Delta\Psi_m$ 显著高于对照组（P<0.05）。线粒体移植可以明显提高水牛孤雌激活胚胎各时期的 $\Delta\Psi_m$ ，但不改变在胚胎发育过程中 $\Delta\Psi_m$ 的总体变化趋势（图 3-3）。

表 3-3 MIT 对水牛胚胎线粒体膜电位的影响

Table.3-3 The effect of MIT on mitochondrial membrane potential of buffalo embryos

组别	线粒体膜电位值 $\Delta\Psi_m$				
	2-细胞期	4-细胞期	8-细胞期	桑椹胚期	囊胚期
Groups	Stage of 2-cell	Stage of 4-cell	Stage of 8-cell	Morula stage	Blastocyst stage
移植组	0.3428±0.0742 ^A	0.3371±0.0556 ^A	0.3079±0.0814 ^a	0.4552±0.0427 ^a	0.5518±0.0538 ^a
对照组	0.2306±0.0433 ^B	0.2318±0.0471 ^B	0.2460±0.0533 ^b	0.3915±0.0411 ^b	0.5165±0.0494 ^b

注：同列标注不同小写字母表示差异显著(P<0.05)，肩标不同大写字母表示差异极显著（P<0.01）。
Note: data with different small letters in the same column mean significant difference (P<0.05), different capital letters indicate highly significant differences (P<0.01).

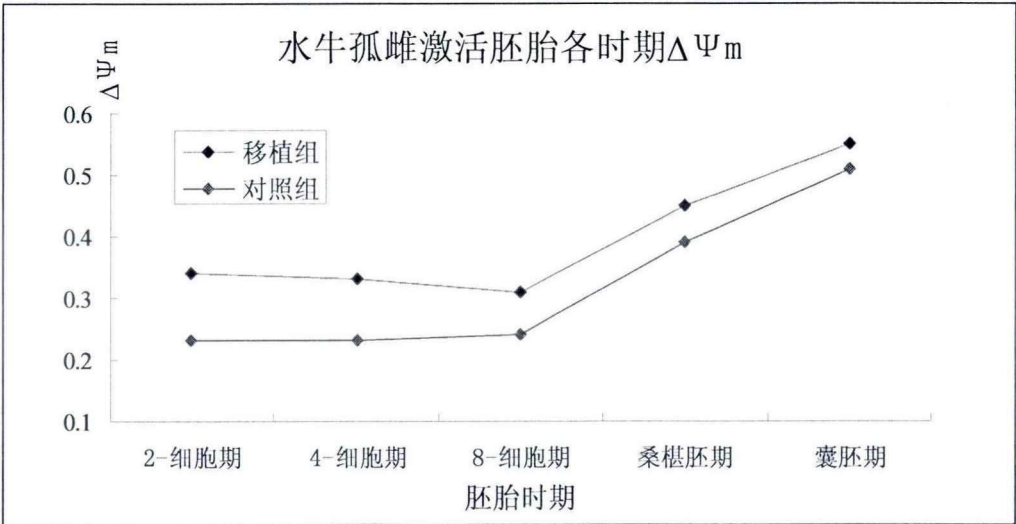


图 3-3. 水牛孤雌激活胚胎各时期 $\Delta\Psi_m$

Fig 3-3. The $\Delta\Psi_m$ of buffalo parthenogenetic embryos in different stage

3 讨论

在对卵胞质移植和体细胞核移植的研究发现，虽然供体细胞的 mtDNA 进入受体卵母细胞后会随着胚胎的发育发生遗传漂变或降解而逐渐减少，甚至全部消失。但也有少量的 mtDNA 可以被同化并参与受体胚胎的发育，并可以遗传给后代^[75]。这说明在受体卵母细胞内没有生物学机制上可以彻底破坏外源线粒体的酶类存在，受体卵母细胞胞质对外源线粒体具有一定程度的可兼容性。本试验将颗粒细胞线粒体移植到水牛卵母细胞中并进行孤雌激活处理，发现被标记的外源线粒体会随着胚胎的发育逐渐向周围扩散，

并被分配到卵裂球中，至桑椹胚阶段仍有部分细胞可以观察到微弱荧光，但多数细胞荧光强度会随着胚胎发育越来越弱。这可能是由于移植的线粒体数量有限（约 3000~5000 个），随着胚胎发育部分外源线粒体活性丧失并被逐步降解，从而导致荧光消失，同时线粒体荧光探针也会随着观察次数的增多而发生荧光淬灭。因此，荧光探针标记这一方法只能初步观察外源线粒体移植后的分布和移动等情况，对于外源线粒体移植后的存活时间、功能发挥以及自我复制等情况则需要进一步深入研究。

由于二三级水牛卵母细胞的胚胎发育率较一级卵母细胞明显偏低，因此二、三级水牛卵母细胞的发育潜能具有较大的提高空间，且结合本实验室水牛卵母细胞材料有限等实际情况，主要选择对二、三级卵母细胞进行线粒体移植。结果发现线粒体移植可以一定程度提高二级卵母细胞孤雌激活胚胎的发育能力，MIT 组 8-细胞期后的胚胎发育率显著高于对照组（ $P<0.05$ ）。这一结果与王晓磊^[80]的实验结果相似，其对黄牛卵母细胞行 MIT 并进行孤雌激活，桑椹胚发育率极显著高于对照组（ $P<0.01$ ）。这可能是由于本试验所用材料为水牛二级卵母细胞，而王晓磊所选用的材料为排出第一极体的黄牛卵母细胞，二者在质量具有一定的差异。试验发现，虽然 MIT 组与对照组相比卵裂率无显著差异，但都显著高于空注组（ $P<0.01$ ），这一结果说明显微操作对细胞造成了一定的机械损伤，同时也说明胚胎培养液移植对胚胎的发育有明显的伤害作用。同时试验发现，MIT 对三级卵母细胞的胚胎发育率无明显改善作用。结合第二章结果可知，二、三级卵母细胞的 mtDNA 拷贝过低，尤其是三级卵母细胞，说明三级卵母细胞胞质成熟不完全，线粒体在成熟过程中没有大量复制积累，其发育能力显著降低。Blekrom^[15]和 Spikings 等^[100]研究指出，正常的卵母细胞内 ATP 和 mtDNA 的含量有一定阈值，只有当两者的含量达到这个阈值胚胎才能正常发育，而对三级水牛卵母细胞注入有限的外源线粒体可能无法提高其 ATP 和 mtDNA 的含量达到这个阈值，因而对胚胎的发育无明显改善作用。

线粒体膜电位 $\Delta\Psi_m$ 是衡量线粒体活性以及生物学功能的指标，是保证线粒体电子传递链和氧化磷酸化形成、ATP 的正常供应的前提。本试验对早期胚胎线粒体膜电位测定时发现，正常孤雌激活胚胎从 2-细胞期至囊胚期，其线粒体膜电位值（ $\Delta\Psi_m$ ）总体呈上升趋势，这与刘延荷等^[101]对小鼠的研究结果一致。这可能是由于随着胚胎的发育进行，胚胎的耗能越来越多，会不断激活一些原来可能处于“休眠”状态的线粒体参与供能，从而提高了胚胎的 $\Delta\Psi_m$ 。同时，MIT 组的 2-细胞和 4-细胞期孤雌激活胚胎的 $\Delta\Psi_m$ 值极显著高于对照组（ $P<0.01$ ）；MIT 组的 8-细胞期、桑椹胚期和囊胚期孤雌激活胚胎的 $\Delta\Psi_m$ 值显著高于对照组（ $P<0.05$ ）。这可能是由于被移植的线粒体具有较高的活性，其 $\Delta\Psi_m$

较高,从而增加了胚胎整体的 $\Delta\Psi_m$ 值。但随着胚胎的发育,部分线粒体未能适应受体胞质的同化调节而被逐步降解,其余部分线粒体则可以持续保持活性并参与胚胎的发育。在卵裂期胚胎,不同的卵裂球的 $\Delta\Psi_m$ 也不尽相同,在卵裂球中 $\Delta\Psi_m$ 的分布也存在一定的差异。Diaz^[102]和 Blerkom^[103]等发现在大部分卵裂球的边缘线粒体的 $\Delta\Psi_m$ 较高,而卵裂球相邻的区域荧光度较弱,即 JC-1 聚合物分布较少,线粒体的 $\Delta\Psi_m$ 偏低,这也与本试验观察到的结果相似。本试验发现线粒体移植虽然改变了水牛各时期胚胎的 $\Delta\Psi_m$,但未改变胚胎发育过程中 $\Delta\Psi_m$ 的总体变化趋势。

4 结论

4.1 外源线粒体移植后,在一定时间内,可持续具有活性并参与了早期胚胎发育的过程。

4.2 颗粒细胞线粒体移植可以一定程度上提高水牛二级卵母细胞的发育潜能,但对三级卵母细胞的发育无明显促进作用。

4.3 线粒体移植可以明显提高水牛植入前各时期胚胎的 $\Delta\Psi_m$ 。

参考文献

- [1] STOJKOVIC M, MACHADO S A, STOJKOVIC P, et al. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture [J]. *Biology of reproduction*, 2001, 64(3): 904-9.
- [2] NISHI Y, TAKESHITA T, SATO K, et al. Change of the mitochondrial distribution in mouse ooplasm during in vitro maturation [J]. *Journal of Nippon Medical School*, 2003, 70(5): 408-15.
- [3] SUN Q, WU G, LAI L, et al. Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development in vitro [J]. *Reproduction*, 2001, 122(1): 155-63.
- [4] 刘姗, 李媛, 高选, 等. 人卵母细胞体外成熟前后线粒体分布的变化 [J]. *解剖学报*, 2007, 38(5): 593-6.
- [5] 曲杨燕, 刘云海, 郭勇, 等. 绵羊卵母细胞体外成熟过程中的线粒体分布变化 [J]. *畜牧兽医学报*, 2009, 8(027).
- [6] DUMOLLARD R, MARANGOS P, FITZHARRIS G, et al. Sperm-triggered $[Ca^{2+}]$ oscillations and Ca^{2+} homeostasis in the mouse egg have an absolute requirement for mitochondrial ATP production [J]. *Development*, 2004, 131(13): 3057-67.
- [7] 王晓磊. 颗粒细胞线粒体移植对牛孤雌胚胎发育的影响 [D]; 西北农林科技大学, 2006.
- [8] JANSEN R P, DE BOER K. The bottleneck: mitochondrial imperatives in oogenesis and ovarian follicular fate [J]. *Molecular and cellular endocrinology*, 1998, 145(1): 81-8.
- [9] KANEDA H, HAYASHI J, TAKAHAMA S, et al. Elimination of paternal mitochondrial DNA in intraspecific crosses during early mouse embryogenesis [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1995, 92(10): 4542-6.
- [10] NAVIAUX R K, MCGOWAN K A. Organismal effects of mitochondrial dysfunction [J]. *Human Reproduction*, 2000, 15(suppl 2): 44-56.
- [11] 唐兆新, 王炫英. 氧自由基在细胞凋亡中的作用 [J]. *畜牧兽医杂志*, 1997, 16(3): 52-4.
- [12] HENGARTNER M O. Apoptosis: death cycle and Swiss army knives [J]. *Nature*, 1998, 391(6666): 441-.
- [13] RIZZUTO R, PINTON P, CARRINGTON W, et al. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca^{2+} responses [J]. *Science*, 1998, 280(5370): 1763-6.
- [14] WYLLIE A H. Apoptosis: an overview [J]. *British Medical Bulletin*, 1997, 53(3): 451-65.
- [15] VAN BLERKOM J, SINCLAIR J, DAVIS P. Mitochondrial transfer between oocytes: potential applications of mitochondrial donation and the issue of heteroplasmy [J]. *Human Reproduction*, 1998, 13(10): 2857-68.
- [16] KRAKAUER D C, MIRA A. Mitochondria and the death of oocytes [J]. *Nature*, 2000, 403(6769): 501-.
- [17] REYNIER P, MAY-PANLOUP P, CHRETIEN M, et al. Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes [J]. *Molecular Human Reproduction*, 2001, 7(5): 425-9.
- [18] TARAZONA A, RODRIGUEZ J, RESTREPO L, et al. Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced in vitro [J].

- Reproduction in Domestic Animals, 2006, 41(1): 5-11.
- [19] TZENG C, HSIEH R, CHANG S, et al. Pregnancy derived from mitochondria transfer (MIT) into oocyte from patient's own cumulus granulosa cells (cGCs) [J]. Fertility and Sterility, 2001, 76(3): S67-S8.
- [20] LEVRAN D, BEN-SHLOMO I, DOR J, et al. Aging of endometrium and oocytes: observations on conception and abortion rates in an egg donation model [J]. Fertility and Sterility, 1991, 56(6): 1091.
- [21] LYDIC M, LIU J, REBAR R, et al. Success of donor oocyte in in vitro fertilization-embryo transfer in recipients with and without premature ovarian failure [J]. Fertility and Sterility, 1996, 65(1): 98.
- [22] 焦泽旭, 庄广伦, 周灿权, 等. 高龄妇女接受体外受精-胚胎移植的结局 [J]. 中华妇产科杂志, 2002, 37(4): 223-6.
- [23] BENADIVA C, KLIGMAN I, MUNNE S. Aneuploidy 16 in human embryos increases significantly with maternal age [J]. Fertility and Sterility, 1996, 66(2): 248-55.
- [24] YARON Y, BOTCHAN A, AMIT A, et al. Endometrial receptivity in the light of modern assisted reproductive technologies [J]. Fertility and Sterility, 1994, 62(2): 225-32.
- [25] NAVOT D, BERGH R, WILLIAMS M A, et al. Poor oocyte quality rather than implantation failure as a cause of age-related decline in female fertility [J]. The Lancet, 1991, 337(8754): 1375-7.
- [26] LIU L, KEEFE D L. Ageing-associated aberration in meiosis of oocytes from senescence-accelerated mice [J]. Human Reproduction, 2002, 17(10): 2678-85.
- [27] TAR N J J, PREZ - ALBAL S, CANO A. Oral antioxidants counteract the negative effects of female aging on oocyte quantity and quality in the mouse [J]. Molecular reproduction and development, 2002, 61(3): 385-97.
- [28] FUJINO Y, OZAKI K, YAMAMASU S, et al. Ovary and ovulation: DNA fragmentation of oocytes in aged mice [J]. Human Reproduction, 1996, 11(7): 1480-3.
- [29] WU J, ZHANG L, WANG X. Maturation and apoptosis of human oocytes in vitro are age-related [J]. Fertility and Sterility, 2000, 74(6): 1137-41.
- [30] ISHIKAWA H, ENDO A. Prolongation of duration of ovulation in ageing mice [J]. Journal of reproduction and fertility, 1996, 108(2): 167-70.
- [31] EPPIG J J, SCHULTZ R M, O'BRIEN M, et al. Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes [J]. Developmental biology, 1994, 164(1): 1.
- [32] LEVRON J, WILLADSEN S, BERTOLI M, et al. The development of mouse zygotes after fusion with synchronous and asynchronous cytoplasm [J]. Human Reproduction, 1996, 11(6): 1287-92.
- [33] BARNES F, EYESTONE W. Early cleavage and the maternal zygotic transition in bovine embryos [J]. Theriogenology, 1990, 33(1): 141-52.
- [34] KRN KOV L, URBAN F, MOOR R, et al. Mouse oocyte maturation: the effect of modified nucleocytoplasmic ratio [J]. Reproduction, nutrition, development, 1998, 38(6): 665.
- [35] KISHIMOTO T, OKUMURA E. In vivo regulation of the entry into M-phase: initial activation and nuclear translocation of cyclin B/Cdc2 [M]. Progress in cell cycle research. Springer. 1997: 241-9.
- [36] DL NORTHEY P N, CF ROSENKRANS. Removal of bovine oocyte cytoplasm prior to fertilization reduces cell number in embryos [J]. Biol Reprod, 1991, 44(abstr): 156.
- [37] WESTHUSIN M, COLLAS P, MAREK D, et al. Reducing the amount of cytoplasm available for early embryonic development decreases the quality but not quantity of embryos produced by in vitro fertilization and nuclear transplantation [J].

- Theriogenology, 1996, 46(2): 243-52.
- [38] CR LONG M W, CR LOONEY. Manipulation of early bovine embryos: Effect on subsequent development and embryo quality in vitro [J]. Theriogenology, 1992, 37(abstr): 249.
- [39] HOWLETT S K, BARTON S C, SURANI M A. Nuclear cytoplasmic interactions following nuclear transplantation in mouse embryos [J]. Development, 1987, 101(4): 915-23.
- [40] KONO T, TSUNODA Y. Development of single blastomeres from four - and eight - cell mouse embryos fused into the enucleated half of a two - cell embryo [J]. Gamete research, 1989, 22(4): 427-34.
- [41] 张锁链, 斯琴, 樊秀娥, 等. 小鼠分离胚的培养和移植 [J]. 细胞生物学杂志, 1993, 14(1): 41-4.
- [42] T GREISING P M, A HEALY, A GORDON, M GALLAGHER, H WAHID, I GORDON. The influence of cytoplasmic composition and quantity of cytoplasm in recipient oocytes on the developmental capacity of nuclear transfer embryos [J]. Theriogenology, 1994, 41(abstr): 208.
- [43] BORDIGNON V, SMITH L C. Telophase enucleation: an improved method to prepare recipient cytoplasts for use in bovine nuclear transfer [J]. Molecular reproduction and development, 1998, 49(1): 29-36.
- [44] 周琪, 李子义, 谭景和, 等. 核质比对家兔胚胎发育的影响 [J]. 科学通报, 1999, 44(3): 289-91.
- [45] WILDING M, DALE B, MARINO M, et al. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos [J]. Human Reproduction, 2001, 16(5): 909-17.
- [46] CUMMINS J. Mitochondrial DNA in mammalian reproduction [J]. Reviews of Reproduction, 1998, 3(3): 172-82.
- [47] KA DE BOER R J, DA LEIGH, D MORTIMER. Quantification of mtDNA copy number in the human secondary oocyte [J]. Human Reproduction, 1999, 14(abstr): 92.
- [48] BARRITT J, KOKOT M, COHEN J, et al. Quantification of human ooplasmic mitochondria [J]. Reproductive biomedicine online, 2002, 4(3): 243-7.
- [49] CUMMINS J M, JEQUIER A M, KAN R. Molecular biology of human male infertility: links with aging, mitochondrial genetics, and oxidative stress? [J]. Molecular reproduction and development, 1994, 37(3): 345-62.
- [50] CHEN X, PROSSER R, SIMONETTI S, et al. Rearranged mitochondrial genomes are present in human oocytes [J]. American journal of human genetics, 1995, 57(2): 239.
- [51] KEEFE D, NIVEN-FAIRCHILD T, POWELL S, et al. Mitochondrial deoxyribonucleic acid deletions in oocytes and reproductive aging in women [J]. Fertility and Sterility, 1995, 64(3): 577.
- [52] BATTAGLIA D, GOODWIN P, KLEIN N, et al. Fertilization and early embryology: Influence of maternal age on meiotic spindle assembly oocytes from naturally cycling women [J]. Human Reproduction, 1996, 11(10): 2217-22.
- [53] PLACHOT M. Cytogenetic analysis of oocytes and embryos [J]. Annals of the Academy of Medicine, Singapore, 1992, 21(4): 538.
- [54] BURGOYNE P S, HOLLAND K, STEPHENS R. Incidence of numerical chromosome anomalies in human pregnancy estimation from induced and spontaneous abortion data [J]. Human Reproduction, 1991, 6(4): 555-65.
- [55] VERLINSKY Y, CIESLAK J, FREIDINE M, et al. Pregnancies following pre-conception diagnosis of common aneuploidies by fluorescent in-situ hybridization [J]. Molecular Human Reproduction, 1995, 1(5): 265-9.

- [56] EICHENLAUB-RITTER U. Genetics of oocyte ageing [J]. *Maturitas*, 1998, 30(2): 143-69.
- [57] BARRITT J A, BRENNER C A, WILLADSEN S, et al. Spontaneous and artificial changes in human ooplasmic mitochondria [J]. *Human Reproduction*, 2000, 15(suppl 2): 207-17.
- [58] BRENNER C A, BARRITT J A, WILLADSEN S, et al. Mitochondrial DNA heteroplasmy after human ooplasmic transplantation [J]. *Fertility and Sterility*, 2000, 74(3): 573-8.
- [59] S. C J S R S L L J W. Birth of infant after transfer of anucleate donor oocyte cytoplasm into recipient eggs. [J]. *Lancet*, 1997, 350(187).
- [60] DALE B, WILDING M, BOTTA G, et al. Pregnancy after cytoplasmic transfer in a couple suffering from idiopathic infertility Case report [J]. *Human Reproduction*, 2001, 16(7): 1469-72.
- [61] LANZENDORF S E, MAYER J F, TONER J, et al. Pregnancy following transfer of ooplasm from cryopreserved-thawed donor oocytes into recipient oocytes [J]. *Fertility and Sterility*, 1999, 71(3): 575-7.
- [62] COHEN J, SCOTT R, ALIKANI M, et al. Ooplasmic transfer in mature human oocytes [J]. *Molecular Human Reproduction*, 1998, 4(3): 269-80.
- [63] BARRITT J A, BRENNER C A, MALTER H E, et al. Mitochondria in human offspring derived from ooplasmic transplantation: Brief communication [J]. *Human Reproduction*, 2001, 16(3): 513-6.
- [64] TAKEUCHI T, GONG J, VEECK L L, et al. Preliminary findings in germinal vesicle transplantation of immature human oocytes [J]. *Human Reproduction*, 2001, 16(4): 730-6.
- [65] ZHANG J, WANG C-W, KREY L, et al. In vitro maturation of human preovulatory oocytes reconstructed by germinal vesicle transfer [J]. *Fertility and Sterility*, 1999, 71(4): 726-31.
- [66] KONO T, OBATA Y, YOSHIMZU T, et al. Epigenetic modifications during oocyte growth correlates with extended parthenogenetic development in the mouse [J]. *Nature genetics*, 1996, 13(1): 91-4.
- [67] MOFFA F, COMOGLIO F, KREY L C, et al. Germinal vesicle transfer between fresh and cryopreserved immature mouse oocytes [J]. *Human Reproduction*, 2002, 17(1): 178-83.
- [68] LI G P, CHEN D Y, LIAN L, et al. Viable rabbits derived from reconstructed oocytes by germinal vesicle transfer after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) [J]. *Molecular reproduction and development*, 2001, 58(2): 180-5.
- [69] LI G P, CHEN D Y, LIAN L, et al. Mouse - rabbit germinal vesicle transfer reveals that factors regulating oocyte meiotic progression are not species - specific in mammals [J]. *Journal of Experimental Zoology*, 2001, 289(5): 322-9.
- [70] BAO S, USHIJIMA H, HIROSE A, et al. Development of bovine oocytes reconstructed with a nucleus from growing stage oocytes after fertilization in vitro [J]. *Theriogenology*, 2003, 59(5): 1231-9.
- [71] FRANCIOSI F, PERAZZOLI F, LODDE V, et al. Developmental competence of gametes reconstructed by germinal vesicle transplantation from fresh and cryopreserved bovine oocytes [J]. *Fertility and Sterility*, 2010, 93(1): 229-38.
- [72] LANGE CONSIGLIO A, BIGNOTTI A, PECILE A, et al. Reconstruction of calf oocytes by germinal vesicle transfer in mature bovine oocytes: preliminary results [J]. *Veterinary research communications*, 2009, 33(89-92).
- [73] KOBAYASHI M, SATO K. Mitochondrial behavior and localization in reconstituted oocytes derived from germinal vesicle transfer [J]. *Human cell*, 2008, 21(1): 7-11.

- [74] BAO S, OBATA Y, ONO Y, et al. Nuclear competence for maturation and pronuclear formation in mouse oocytes [J]. Human Reproduction, 2002, 17(5): 1311-6.
- [75] HIENDLEDER S, SCHMUTZ S M, ERHARDT G, et al. Transmitochondrial differences and varying levels of heteroplasmy in nuclear transfer cloned cattle [J]. Molecular reproduction and development, 1999, 54(1): 24-31.
- [76] C TZENG S H, N CHANG. Pregnancy derived from mitochondrial transfer (MIT) into oocyte from patient's own cumulus cells (cGCs) [J]. Fertility and Sterility, 2001, 76(abstract): 180.
- [77] 孔令红 刘忠, 李红, 等. 自体颗粒细胞线粒体移植对胚胎发育质量的影响[J]. 中华妇产科杂志, 2004, 39(2): 3.
- [78] 刘锋, 杨华, 卢克焕, 等. 卵丘细胞线粒体移植对年老小鼠早期胚胎发育的影响[J]. 中国临床医药研究杂志, 2006, 10(S): 1-2.
- [79] YI Y-C, CHEN M-J, HO J Y-P, et al. Mitochondria transfer can enhance the murine embryo development [J]. Journal of assisted reproduction and genetics, 2007, 24(10): 445-9.
- [80] 王晓磊 雷安民, 窦忠英. 异体颗粒细胞线粒体移植对牛孤雌激活胚胎发育的影响 [J]. 西北农林科技大学学报, 2007, 35(3): 28.
- [81] IRWIN M H, JOHNSON L W, PINKERT C A. Isolation and microinjection of somatic cell - derived mitochondria and germline heteroplasmy in transmitochondrial mice [J]. Transgenic research, 1999, 8(2): 119-23.
- [82] 陆凤花, 石德顺, 韦英明, 等. 供体细胞来源对水牛体细胞核移植效果的影响 [J]. 第三届广西青年学术年会论文集 (自然科学篇), 2004,
- [83] DORLAND M, VAN KOOIJ R, TE VELDE E. General ageing and ovarian ageing [J]. Maturitas, 1998, 30(2): 113-8.
- [84] BRENNER C A, WOLNY Y M, BARRITT J A, et al. Mitochondrial DNA deletion in human oocytes and embryos [J]. Molecular Human Reproduction, 1998, 4(9): 887-92.
- [85] 孔令红, 刘忠, 李红. 首例经自体颗粒细胞线粒体移植的双胞胎儿出生 [J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(990).
- [86] BUCCIONE R, SCHROEDER A C, EPPIG J J. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis [J]. Biology of reproduction, 1990, 43(4): 543-7.
- [87] EPPIG J J, SCHROEDER A C. Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation, and fertilization in vitro [J]. Biology of reproduction, 1989, 41(2): 268-76.
- [88] 王锋. 颗粒细胞生长发育及其在卵泡发生中的作用 [J]. 国外兽医学: 畜禽疾病, 1994, 15(4): 8-12.
- [89] 石德顺 卢克焕. 牛卵泡液对牛卵母细胞体外成熟的影响 [J]. 广西农业大学学报, 1994, 13:5.
- [90] 杨永梅, 陈娟, 陈洋, 等. 哺乳动物卵泡颗粒细胞体外培养研究概况 [J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(003): 135-8.
- [91] 许川, 舒为群, 张亮, 等. 大鼠原代颗粒细胞的培养与鉴定 [J]. 技术与方法, 2008, 21((3)): 234-7.
- [92] 朱丽, 郭成志, 邓思君, 等. 猪卵巢颗粒细胞分离培养及鉴定 [J]. 中国兽医杂志, 2011, 47(4): 21-2.
- [93] SIRARD M, BILODEAU S. Granulosa cells inhibit the resumption of meiosis in bovine oocytes in vitro [J]. Biology of reproduction, 1990, 43(5): 777-83.
- [94] SIRARD M, COENEN K, BILODEAU S. Effect of fresh or cultured follicular fractions on meiotic resumption in bovine oocytes [J]. Theriogenology, 1992, 37(1):

- 39-57.
- [95] EPPIG J J. Growth and development of the mammalian oocyte-granulosa cell complex in culture [J]. *Biology and Pathology of the Oocyte: Role in Fertility and Reproductive Medicine* Cambridge University Press, Cambridge, 2003, 273-82.
- [96] 王晓丽, 杨娟, 陈玉, 等. 水牛卵丘颗粒细胞凋亡与卵母细胞体外发育潜能的研究 [J]. *畜牧兽医学报*, 2009, 009: 1400-4.
- [97] 华松. 体细胞核移植及线粒体命运的研究 [D]; 西北农林科技大学, 2007.
- [98] REYNIER P, CHR TIEN M-F, SAVAGNER F, et al. Long PCR analysis of human gamete mtDNA suggests defective mitochondrial maintenance in spermatozoa and supports the bottleneck theory for oocytes [J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 1998, 252(2): 373-7.
- [99] STEUERWALD N, COHEN J, HERRERA R J, et al. Quantification of mRNA in single oocytes and embryos by real-time rapid cycle fluorescence monitored RT-PCR [J]. *Molecular Human Reproduction*, 2000, 6(5): 448-53.
- [100] SPIKINGS E C, ALDERSON J, JOHN J S. Transmission of mitochondrial DNA following assisted reproduction and nuclear transfer [J]. *Human Reproduction Update*, 2006, 12(4): 401-15.
- [101] 刘延荷, 刘凯, 连方, 等. 卵母细胞线粒体移植对年老小鼠植入前胚胎线粒体膜电位的影响 [J]. *山东大学学报 (医学版)*, 2009, 47(1):
- [102] DIAZ G, SETZU M D, ZUCCA A, et al. Subcellular heterogeneity of mitochondrial membrane potential: relationship with organelle distribution and intercellular contacts in normal, hypoxic and apoptotic cells [J]. *Journal of Cell Science*, 1999, 112(7): 1077-84.
- [103] VAN BLERKOM J, DAVIS P, MATHWIG V, et al. Domains of high-polarized and low-polarized mitochondria may occur in mouse and human oocytes and early embryos [J]. *Human Reproduction*, 2002, 17(2): 393-406.

图片说明

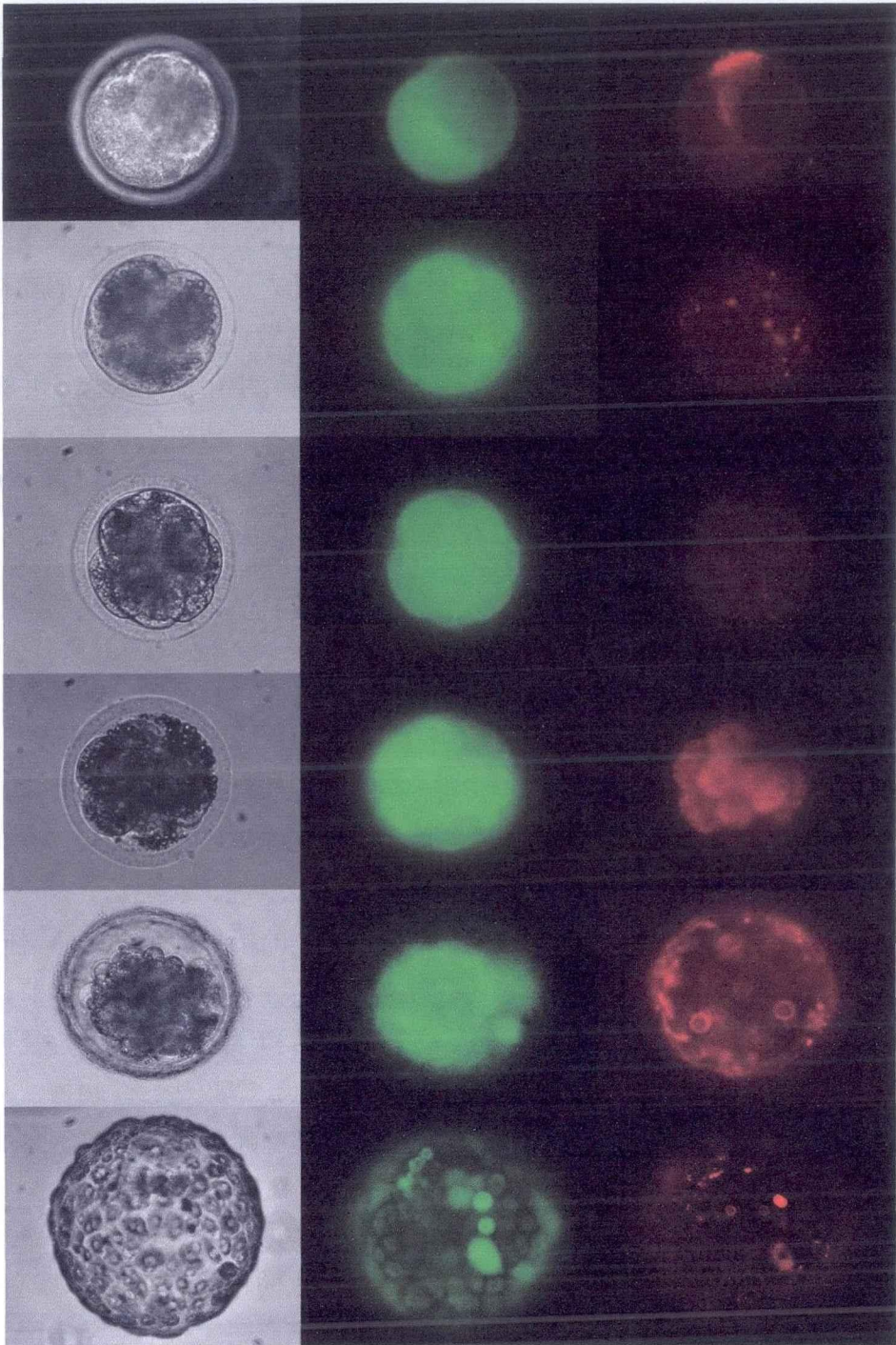


图 1. 各时期胚胎 JC-1 探针染色后可见光、绿色荧光、红色荧光图片 (×400)，从上到下依次为 2-细胞期胚胎、4-细胞期胚胎、8-细胞期胚胎、桑葚胚、囊胚和孵化囊胚。

Fig1. Images of each stage of the embryos stained by JC-1 under a visible light, green fluorescence and red fluorescence (400×), it is 2- cell stage embryos, 4- cell stage embryos, 8- cell stage embryos, morula, blastocyst and hatched blastocyst from top to bottom.

致 谢

时光飞逝，转眼间三年的研究生生活即将结束，回首往昔，那些曾经的感动、温暖、欢笑和悲伤历历在目。值此毕业之际，我谨向所有关心、爱护、帮助我的人们表示最诚挚的感谢和最美好的祝愿。

本论文是在我的导师石德顺研究员和陆凤花研究员的悉心指导之下完成的。首先，我要感谢我的导师石德顺研究员，感谢他给我们提供了良好的实验平台和学习环境。石老师渊博的学识、严谨的科研态度和正直随和的人格魅力是我今后学习的榜样，并将指导着我以后的人生之路。在此我向石老师表达我崇高的敬意。

我还要特别感谢我的导师陆凤花研究员，三年的研究生生活，她给予并教会了我很多很多。本论文从选题、实验到最后论文的撰写，每一步都是在陆老师的悉心指导下完成的，这其中倾注了她大量的心血。实验中遇到的困难，她总是在第一时间帮我分析，解决。在这三年里，我非常感谢陆老师对我的悉心栽培与指导。在此，我想对陆老师说，您辛苦了，感谢您为我所做的一切，这将是我一生中最值得回忆的财富。在此我向您表示我最诚挚的谢意和祝福！

另外还要感谢课题组的李湘萍老师、刘庆友老师、崔奎青老师、杨素芳老师、罗婵老师、邓彦飞老师、邓海莹老师在实验上的帮助和指导；感谢蒋建荣老师给予我们实验和生活上帮助与关心。还要特别感谢孙洪亮、刘晓华、朱鹏、乔树叶等师兄师姐，给我的试验提供良好的建议和指导，在我试验遇到困难时能及时给予我积极的帮助与支持。感谢张顺、李楠、罗婷、蒙丽娜、冯万友、任艳萍、黄章虎、祝晓丽、陈施蓓、王锦、刘帅、刘金凤、路新梅、张会娜等师兄师姐对我实验上的指导与帮助；感谢同一级的马帆、柯浩、劳艳萍、刘荣立、陈东峰、田明明、李云芳、林浪、龚云、苏节、王梦、沈开元、雷小灿、赵海峰、吕玲燕、刘真真等同学在生活和学习上的帮助，是你们陪伴我走过了这难忘的三年研究生生活；感谢杜姗姗、阮子云、李政达、管晓梅、马玉洁、吴柱莲、雷钊、阮秋燕、刘晓淋、杜凤娇、王萍、何金娜等师弟师妹在我平时的实验中给予的帮忙。

最后，感谢我要深深的感谢我的父母、哥哥、姐姐，在我成长的道路上给予我支持、关心与鼓励，你们为我付出了太多太多，我会将尽其一生的报答你们，我永远爱你们！

攻读硕士期间发表学术论文

1 高亚可, 陆凤花, 马帆等.水牛卵巢颗粒细胞的分离培养及凋亡测定.中国畜牧兽医, 2012(39).10.140-144.

2 马帆, 高亚可, 朱鹏等.增殖细胞核抗原在水牛腔前卵泡中的表达与卵巢组织定位.中国农业科学, 2013 (已接受) .

3 孙洪亮, 蔡强, 高亚可等.亚硒酸钠对小鼠附植前胚胎发育能力的影响.湖北农业科学, 2013 (52).1.127-129.

4 高亚可.水牛卵巢颗粒细胞的分离培养及凋亡测定. 2012.中国畜牧兽医学会动物繁殖学分会第十六届学术研讨会论文集.