

卵丘细胞线粒体移植对年老小鼠早期胚胎发育的影响

刘 锋¹, 杨 华¹, 卢克焕², 丘 映¹

(1. 广西医科大学第三附属医院、广西南宁市第二人民医院生殖医疗中心, 南宁 530031;

2. 广西大学动物繁殖研究所)

【摘要】 目的 探讨线粒体对早期胚胎发育的影响。方法 采用昆明小鼠为动物模型, 以其卵丘颗粒细胞、卵母细胞、受精卵为试验材料, 提取年老小鼠卵丘细胞线粒体, 将其注入年老小鼠卵母细胞和体内冲出的受精卵中。结果与结论 通过卵丘细胞线粒体移植, 给卵子补充了一定的线粒体, 可以部分弥补卵母细胞因变异引起的功能不足。为第2次减数分裂、受精卵和胚胎发育提供足够的能量, 明显改善了胚胎的质量。

【关键词】 卵丘细胞; 线粒体移植; 凋亡; 早期胚胎

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2007)10-0592-04

Effect of Mitochondria Transplantation from Cumulus Granular Cells into Early Embryos of Ageing Mice

LIU Feng, YANG Hua, LU Ke-huan, QIU Ying

(1. Reproductive Medicine Center, The Third Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530031, China;

2. Research Institute of Animal Reproduction, Guangxi University)

【Abstract】 **Objective** To assess the effect of mitochondria from cumulus granular cells transplanted into early embryos of ageing mice. **Methods** Kunming mice were used as experiment animal model, and the cumulus granular cells, oocytes, zygotes were used as experimental material. Mitochondria were taken from cumulus granular cells, purified and injected into oocytes and zygotes of ageing mice. **Results** The blastulation rate of ICSI group and ICSI + MIT group were 24.98% and 32.54%, respectively, ($P < 0.05$). The cleavage rate and blastulation rate in the sham injection group were 39.33% and 19.67%, those of MIT group were 67.90% and 51.54%, respectively. There was a significant difference between the sham injection and MIT groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Mitochondria transplantation can improve the development potential of early embryos of ageing mouse.

【Key words】 Cumulus granular cells; Mitochondria, transplantation; Early embryo; Mouse, aging

体外培养人未成熟卵母细胞与年轻妇女的卵母细胞相比, 年龄大的妇女其未成熟卵的体外成熟率下降, 而凋亡率增加, 老龄小鼠经超排刺激后获得的卵母细胞凋亡发生率增加^[1], 同时这些卵母细胞中线粒体异常聚集。Krakauer等^[2]提出卵子的死亡是对线粒体DNA突变堆积的一种解救方式, 使得那些

带有突变mtDNA的卵母细胞被清除。为了检验二者的推测, Perez等^[3]从卵泡颗粒细胞分离出线粒体, 然后将少量的线粒体(约 5×10^3)输注给在体外易于凋亡的FVB小鼠的卵母细胞中, 观察其是否可以阻止这些卵母细胞的凋亡, 结果发现实验组24 h内36%的卵母细胞发生凋亡, 而对照组(未输注

线粒体或仅输注缓冲液)70%的卵母细胞发生了凋亡。因此,研究年老小鼠的线粒体移植对早期胚胎发育的影响,不但可以为临床上人的卵母细胞线粒体移植摸索一个切实可行的方法,更可以为线粒体移植的安全性提供理论依据。

本研究采用昆明小鼠为动物模型,以其卵丘颗粒细胞、卵母细胞、受精卵为试验材料,提取年老小鼠卵丘细胞线粒体,将其注入年老小鼠卵母细胞和体内冲出的受精卵中,以探讨线粒体对早期胚胎发育的影响。

1 材料和方法

1.1 试验试剂及药品

石蜡油(Sigma公司),PMSG(宁波兽药公司),HCG(珠海丽珠公司),KCL注射用水,透明质酸酶(美国Sigma公司)。人血白蛋白(HAS 3001),HIF-1020(受精液),Q'HIF-1026(卵裂培养液),Q'HIF1029(囊胚培养液),Q-HEPES-HIF1023(外用洗液)等Q氏系列均为美国Sage IVF, Inc.公司的产品。Hanks液等无机盐液为Sigma公司产品。

1.2 研究对象

选用昆明小鼠,购置于广西医科大学实验动物中心(许可证号:Sexk桂2003-0003)。小鼠在4~6周左右开始生育,8周左右生育能力旺盛,1年左右小鼠生育能力降低。所以本实验选择年轻小鼠在2月龄左右;年老大鼠在12月龄左右。

1.3 试验方法

1.3.1 卵丘细胞提取:(1)分别给7~11周龄年轻雌性小鼠和12月龄左右的老龄雌性小鼠腹腔注射10 IU的PMSG,48 h后再腹腔注射10 IU hCG。注射hCG后15~16 h后从小鼠输卵管的膨大部收集卵丘卵母细胞团。用0.1%透明质酸酶液3~5 min处理卵丘细胞团,以便分离卵丘细胞。(2)用无Ca²⁺/Mg²⁺的Hanks液(含双抗)收集卵丘细胞悬浮液。(3)置于1.5 mL离心管1 200 r/min离心2~5 min,弃去上清液。用Hanks液继续洗涤1~2次,最后用Hanks液悬垂卵丘细胞即获得卵丘细胞悬浮液。此过程应在最短的时间内完成。

1.3.2 卵母细胞的收集:按1.3.1 (1)的方法收集12月龄雌小鼠的卵丘卵母细胞复合体。然后在添加有80 IU/mL透明质酸酶的Q-Hepes-HIF液中进行消化,用巴氏吸管轻轻吹打COC复合体,消化掉表面的卵丘细胞,将卵母细胞在HEPES液中洗涤6

遍后置于HIF-1020的操作液中,放入37℃5%CO₂箱中备用。

1.3.3 精子的收集:取昆明白雄鼠1只,断颈处死,取其输精管及附睾,用镊子轻轻挤出其中成熟的精子,放Q, Hepes-HIF溶液中连续洗涤、6倍稀释,用10 μL移液枪取上层活力好游动性大的精子置于7% (W/V) PVP精子操作液中备用。

1.3.4 受精卵的收集:12月龄左右的大龄雌性小鼠腹腔注射10 IU的PMSG,48 h后再腹腔注射10 IU HCG,与公鼠1:1合笼,15~16 h后从小鼠输卵管的膨大部收集卵丘卵母细胞团。其作步骤与1.3.1—(1)相同。

1.3.5 线粒体的收集:卵丘细胞线粒体的提取:由步骤1.3.1将卵丘细胞用HIF培养液离心洗涤后,记数卵丘细胞的数量不少于10⁶个。置匀浆器将卵丘细胞匀浆4~6次,在4℃的冷冻离心机2 000 r/min离心20 min;取上2/3的上清液用10 000 r/min离心20 min。弃上清液,沉淀的线粒体用0.5 μL平衡后10% HSA1020培养液悬浮,并放4℃冰箱备用。

2 试验步骤

2.1 单精子胞质内显微注射及线粒体移植

在Leica倒置显微操作仪下进行小鼠卵母细胞单精子胞质内显微注射(intracytoplasmic spermatoocyte injection, ICSI)操作。线粒体移植准备工作同做ICSI。将制动的精子吸入显微注射针(直径6 μm),并移入线粒体微滴吸入约1~1.5个卵子直径长度的液体。使卵母细胞的第一极体置于相当于时针“6”点的位置,注射针在相当于“3”点位置穿过透明带,向着“9”点的方向深入,吸少量细胞质,确定卵质膜已破,然后将线粒体与精子一同注入卵细胞浆内。用这种方法移植到每个卵子的液体约是卵子体积的1%,线粒体3 000个左右。

2.2 受精卵线粒体移植

具体操作方法同上,不同的是在Leica倒置显微操作仪下进行小鼠受精卵的纯MIT注入。先回吸少量细胞质,确定卵质膜已破,然后将线粒体注入受精卵内。用这种方法移植到每个卵子的线粒体数约为3 000个左右。

2.3 空注

由于线粒体移植对小鼠受精卵造成了一定的机械损伤,而且对于小鼠卵来说,机械损伤会对试验结果有很大的影响。为了检验是否线粒体移植对受精

卵发育有影响,本试验在 MIT 的同时,设置了空注培养液液组,即在 Leica 倒置显微操作仪下,将显微注射针,移入平衡后的 HIF-1020 微滴中,并吸入约 1~1.5 个卵子直径长度的液体,注入受精卵中。

2.4 注射后的卵母细胞培养

采用微滴培养,在 Flecon (2003) 培养皿中,将 10% SPS 的 1026 培养液做成含量 15 μ L 的 10 个微滴,并在培养皿上做上标志,将实验步骤 1、2、3 组注射完毕后的卵母细胞分别移入液滴中,放入 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养箱中培养。19~22 h 观察卵母细胞受精、分裂情况。在培养 48 h 后,移入 ART-1029 囊胚培养液中继续培养。并分别记录分裂细胞囊胚形成的情况。

3 统计学方法

实验所得数据采用 SPSS 软件进行 *t* 检验。

4 结果

4.1 卵丘细胞线粒体移植 (MIT) 对年老小鼠早期胚胎发育的影响

本试验分为单纯 ICSI 组作为对照组,与试验 ICSI+MIT 组。结果见表 1:

表 1 MIT 对老龄小鼠早期胚胎发育的影响 ($n = 8$)

Tab.1 The effect of mitochondria transplantation on early embryo development of aging mice ($n = 8$)

组别 Group	注射成熟卵子数 Number of injected mature oocytes	存活卵子数 Number of survival oocytes	分裂率 % Cleavage rate	囊胚率 % Blastulation rate
ICSI	262	72 (27.23%)	36 (50) ^a	18 (24.98) ^a
ICSI+MIT	312	95 (30.27%)	53 (56.9) ^a	30 (32.54) ^b

不同字母之间表示差异显著, $P < 0.05$ 。Note: The different letters indicate a significant difference, $P < 0.5$

由表 1 所显示的结果得知,单纯 ICSI 组与 ICSI+MIT 组的分裂率,50% vs. 56.9%,即 2-细胞率无显著差异,囊胚率 24.98% vs. 32.54%,差异显著 ($p < 0.05$)。

4.2 卵丘细胞线粒体移植到受精卵对年老小鼠早期胚胎发育影响

本试验以不注射组为对照组,以空注液体组和 MIT 组为试验组,比较 MIT 对受精卵发育的影响。空注液体组是为了与 MIT 组形成相同的机械刺激。结果见表 2。

由表 2 所显示的结果所示,以不注射组为对照组,分裂率和囊胚率分别为 60.6%、46%,而空注组的分裂率与囊胚率为 39.33%、19.67%,与对照组比

表 2 MIT 对小鼠受精卵发育的影响 ($n = 5$)

Tab.2 The effect of MIT on the zygote development of ageing mice ($n = 5$)

组别 Group	注射受精卵数 Number of injected zygotes	存活数 Number of survival zygotes	分裂率 % Cleavage rate	囊胚率 % Blastulation rate
不注射 No-injection	50	50	27 (60.6) ^a	23 (46) ^a
空注 Sham-injection	50	26 (52%)	10 (39.33) ^b	5 (19.67) ^b
MIT	86	54 (62.71%)	37 (67.90) ^a	28 (51.54) ^a

不同字母之间表示差异显著, $P < 0.05$

Note: The different letters indicate significant difference, $P < 0.5$

较,差异都显著 $P < 0.05$; MIT 组的分裂率与囊胚率为 67.90%、51.54%,与对照组比较,差异不显著 ($P > 0.05$),但与空注组比较,差异显著 ($P < 0.05$)。

5 讨论

5.1 卵丘细胞线粒体移植

小鼠一直是研究者常用于进行 ICSI 研究的实验动物。虽然小鼠的 ICSI 操作在技术上以及在卵母细胞的培养系统方面已经比较成熟和完善,但由于小鼠卵母细胞的抗机械损伤能力差,胞质内注射后卵子常常迅速崩解,所以,注射后卵子的存活率及发育率不高。显微注射时,注射针应尽量避免卵子的纺锤体及染色体存在的部位,否则尖锐的注射针可能会损伤到纺锤体,卵子将无法恢复第二次减数分裂。

5.2 线粒体移植可以改善胚胎的发育质量

在人类不同患者的卵子内线粒体的含量是不同的,即使同一个患者的卵子间也有差异。研究发现成熟卵子中的线粒体含量有明显的区别,不能正常受精的卵子线粒体含量低^[4]。在试验中,我们通过卵丘细胞线粒体移植,给卵子补充了一定的线粒体,可以部分弥补因变异引起的功能不足。为第二次减数分裂、受精卵和胚胎发育提供足够的能量,明显改善了胚胎的质量。在卵子分裂方面,线粒体移植对单纯 ICSI 没有显示优势,分裂率为 56.9% vs. 50%,差异无显著性。原因可能是线粒体移植比单纯的 ICSI 操作难度大,回吸卵细胞浆对卵细胞骨架的破坏较重。但随着胚胎的发育,线粒体发挥其功能,线粒体移植对单纯 ICSI 却表现出差异显著性为 32.54% vs. 24.98% (图 1、2)。

5.3 受精卵线粒体移植

本试验将线粒体移植到小鼠的受精卵中,结果发现空注液体组与线粒体移植组无论分裂率 39.33% vs. 67.90% 与囊胚率 19.67% vs. 51.54%

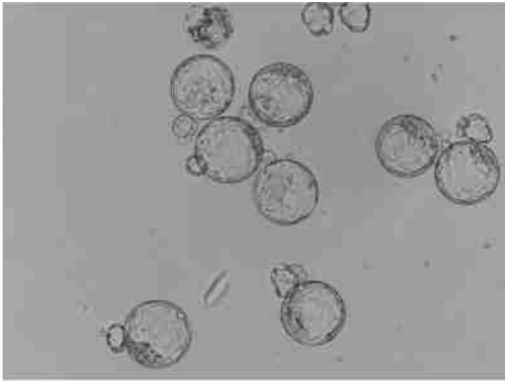


图 1 未注射线粒体囊胚

Fig. 1 Blastulae without mitochondria injection.

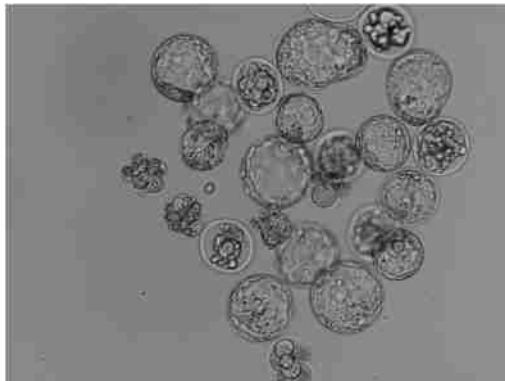


图 2 线粒体注射后囊胚

Fig. 2 Blastulae formed after mitochondria injection.

都存在差异显著,说明在同样的机械损伤情况下,线粒体移植对胚胎发育起明显的促进作用。但线粒体移植组与不注射组的分裂率和囊胚率差异无显著性,可能是由于小鼠配子遭受外界的机械损伤而影响了发育效果。

5.4 人类自体颗粒细胞线粒体移植的安全性

在人类辅助生殖工作中,任何一项新技术的使用都会引发众多争议,其中安全性是最为关注的^[5]。ICSI 在应用初期,人们担心这种操作会把以前不能遗传的疾病传播到下一代:比如睾丸的纤维囊性变、Y 精子微缺失、遗传印记的改变以及注入某些染色体不正常的精子等。1997 年 Cohen 等^[6]报告第一例卵细胞质移植成功后,引发很多争议,焦点问题是此项技术操作是否会影响子代的正常生存。其次是三亲遗传和线粒体间以及线粒体与核 DNA 的相互影响。而且还要从生物学、社会学以及伦理学方面考虑其是否合适。因为卵细胞质移植物内不仅含有线粒体,还含有各种 mRNA 和蛋白质等。正是由于诸

多因素,卵细胞质移植技术已被停止应用。

卵丘细胞来源于患者自身,消除了异体线粒体移植的各种危险因素。且卵丘细胞是最靠近卵子的组织细胞,在卵子的发育过程中提供营养物质和调节因子,两者线粒体的形态和功能有着最大的相似性。我国台湾的曾启瑞教授^[7]在 2001 首次报道了用患者自体颗粒细胞线粒体移植获临床妊娠的消息。

5.5 影响卵丘细胞线粒体移植效果的因素

线粒体参与细胞凋亡早已得到证实。线粒体移植可以改善胚胎的发育质量。但是对于有些个体线粒体移植没有效果。分析原因可能与卵子本身的质量、卵丘细胞的质量以及技术操作本身有关。

卵子本身的质量决定了胚胎发育的潜能。在操作中发现线粒体移植对于一些有明显发育缺陷的卵子没有效果。其中包括卵细胞浆内有黑颗粒区、有大极体或小极体的卵子、透明带间隙过大卵子形态不规则;卵子细胞膜失去韧性穿刺注射后不能恢复或卵子细胞膜脆性过大注射容易死亡。而对于胚胎形态正常的卵子,线粒体移植可以明显改善胚胎的发育质量。

总之,卵丘细胞线粒体移植为提高老龄小鼠早期胚胎发育潜能和胚胎质量提供了比较有效的方法。

参考文献:

- [1] Von Ahnen O, Renken C, Perkins G, et al. Preservation of mitochondrial structure and function after bid or bax-mediated cytochrome c release[J]. *J Cell Biol*, 2000, 150:1027-1036.
- [2] Krakauer DC, Mira A. Mitochondria and germ cell death[J]. *Nature*, 1999, 400:125-126.
- [3] Perez GI, Trbovich AM, Gosden RG, et al. Mitochondria and death of oocytes[J]. *Nature*, 2000, 403:500-501.
- [4] Van Blerkom J, Sinclair J, Davis P, et al. Mitochondrial transfer between oocytes: potential applications of mitochondrial donation and the issue of heteroplasmy[J]. *Hum Reprod*, 1998, 13(10): 2857-2868.
- [5] Stromberg B, Dahlquist G, Ericson, O, et al. Neurological sequelae in children born after in-vitro fertilization: a population-based study[J]. *Lancet*, 2002, 359:461-465.
- [6] Cohen J, Scott R, Alikani M, et al. Ooplasmic transfer in mature human oocytes[J]. *Mol Hum Reprod*, 1998, 14(3):269-280.
- [7] Tzeng C, Hsieh S, Chang N, et al. Pregnancy derived from mitochondrial transfer (MIT) into oocyte from patients own cumulus cell (cGcs)[J]. *Fertil Steril*, 2001, 76: abstract O-180.