

文章编号:1671-7554(2009)01-0006-04

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

刘延荷^{1,2}, 刘凯¹, 连方², 张建伟², 孙振高²

(1. 山东大学医学院组织胚胎学教研室, 济南 250012;

2. 山东中医药大学附属医院生殖中心, 济南 250011)

摘要:目的 探讨卵母细胞线粒体移植(MIT)对年老小鼠植入前胚胎线粒体膜电位($\Delta\Psi_m$)的影响。方法 6~8周龄雌性昆明种小鼠经超排卵、卵胞浆内单精子显微注射(ICSI)及培养液空注后形成的胚胎为A组,12月龄雌性昆明种小鼠经同样处理后形成的胚胎为B组,12月龄雌性昆明种小鼠经超排卵、ICSI及MIT后形成的胚胎为C组。比较植入前各阶段3组胚胎的 $\Delta\Psi_m$ 以及各组胚胎植入前各阶段 $\Delta\Psi_m$ 的变化趋势。结果 在二细胞期和桑椹胚期,A、C两组胚胎 $\Delta\Psi_m$ 均高于B组($P<0.01$),而在四细胞期、八细胞期和囊胚期,A、C两组胚胎 $\Delta\Psi_m$ 亦均高于B组($P<0.05$)。3组中,桑椹胚和囊胚 $\Delta\Psi_m$ 均高于二细胞期、四细胞期和八细胞期胚胎($P<0.05$),而前两者间以及后三者间差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论 卵母细胞MIT可明显提高年老小鼠植入前胚胎各阶段 $\Delta\Psi_m$,且不改变其变化趋势。

关键词:线粒体膜电位;线粒体;移植;年龄;植胚泡;小鼠

中图分类号:R321.1 文献标志码:A

Effect of mitochondrial transfer on the mitochondrial membrane potential of aging mouse pre-implantation embryos

LIU Yan-he^{1,2}, LIU Kai¹, LIAN Fang², ZHANG Jian-wei², SUN Zhen-gao²

(1. Institute of Histology and Embryology, School of Medicine, Shandong University, Jinan 250012, China;

2. Reproduction Center, Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250011, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of mitochondrial transfer (MIT) of aging mouse oocytes on the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) of the subsequent pre-implantation embryos. **Methods** Six to eight-week old female KM BAI mice were super-ovulated, and the oocytes retrieved were treated by intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI) and medium blank injection. The subsequent embryos were distributed in group A. Twelve months old female KM BAI mice were super-ovulated and the oocytes obtained were divided into two subsets. One was treated by ICSI and medium blank injection and the subsequent embryos were included in group B, the other was treated by ICSI and MIT and the subsequent embryos were included in group C. Comparisons were performed on $\Delta\Psi_m$ among the three groups during the pre-implantation stages and on the alterations of $\Delta\Psi_m$ across the pre-implantation stages of each group. **Results** At the 2-cell stage and morula stage, $\Delta\Psi_m$ of embryos from groups A and C were higher than those from group B ($P<0.01$), while at the 4-cell stage, 8-cell stage and blastocyst stage, $\Delta\Psi_m$ of embryos from groups A and C were also higher than those from group B ($P<0.05$). In all of the three groups, $\Delta\Psi_m$ of embryos at either the morula stage or blastocyst stage was higher than those at any other cleavage stage ($P<0.05$), while there were no significant differences between the morula stage and blastocyst stage and also no significant differences among the cleavage stages. **Conclusion** The MIT of aging mouse oocytes can significantly improve the $\Delta\Psi_m$ of subsequent pre-implantation embryos

收稿日期:2008-09-07

基金项目:山东省自然科学基金资助课题(Y2005C63)。

作者简介:刘延荷(1980-),男,硕士研究生,主要从事实验胚胎学研究。

通讯作者:刘凯(1947-),男,教授,主要从事实验胚胎学研究。E-mail:liukai@sdu.edu.cn

without modifying the changing trend of $\Delta\Psi_m$ across pre-implantation stages.

Key words: Mitochondrial membrane potential; Mitochondria; Transplantation; Age; factors; Blastocyst; Mice

在体外受精-胚胎移植(IVF-ET)治疗中,患者年龄与其胚胎发育潜能呈负相关,而线粒体是细胞内参与新陈代谢及细胞凋亡的一种重要细胞器,研究表明,通过对老龄患者卵母细胞行线粒体移植(MIT)可以明显提高其优质胚胎获得率^[1],且目前已成功获得临床妊娠及分娩^[2]。因此,通过 MIT 提高胚胎发育潜能已成为近年来生殖医学领域研究的热点。本研究以年老昆明小鼠为研究对象,利用荧光染料 JC-1 (5, 5', 6, 6'-tetrachloro-1, 1', 3, 3'-tetraethylbenzimidazolyl carbocyanine iodide) 分析线粒体移植对卵母细胞所形成植入前胚胎细胞的线粒体膜电位($\Delta\Psi_m$)的影响,探讨 MIT 提高胚胎发育潜能的机理。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物与分组 未经产成熟雌性昆明种小鼠 100 只,购于山东大学动物实验中心。14 h 光照,10 h 黑暗,自由饮水摄食。分 3 组,A 组为 6~8 周龄小鼠 20 只,对其超排卵后所获卵母细胞进行卵胞浆内单精子显微注射(ICSI)和培养液空注;B 组为 12 月龄小鼠 40 只,对其进行与 A 组小鼠相同的处理;C 组为 12 月龄小鼠 40 只,对其超排卵后所获卵母细胞进行 ICSI 和 MIT。

1.1.2 实验试剂与药品 人绝经期尿促性腺激素(HMG)、人绒毛膜促性腺激素(HCG)均为珠海丽珠公司产品,透明质酸酶、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)均为 In Vitro Care 公司产品,人血清替代品(SSS)、矿物油、mHIF 培养液、HIF 培养液、PI 培养液均为美国 Irvine 公司产品, $\Delta\Psi_m$ 试剂盒(JC-1)为碧云天生物技术研究所产品。

1.2 方法

1.2.1 卵母细胞的收集 对雌鼠注射 HMG 10 IU/只,48 h 后,注射 HCG 10 IU/只,并于注射 HCG 后 14 h 取小鼠卵巢及输卵管,以无菌 TB 针轻轻划破输卵管壶腹部收集卵丘复合物。立即以 80 IU/mL 的透明质酸酶处理卵丘复合物,剔除卵母细胞周围的卵丘细胞。将处理好的卵母细胞移入含 10% SSS 的 mHIF 培养液中反复洗涤 6 次后,选形态较好的 M II 期卵母细胞,置于含 10% SSS 的 HIF 培养液,放入 37 °C,5% CO₂ 培养箱中备用。

1.2.2 精子的获取 取 3~4 月龄雄性昆明小鼠,

取附睾及输精管,于含 10% SSS 的 mHIF 培养液中撕裂,使精子游出,并于 37 °C,5% CO₂ 培养箱中培养 1 h 获能备用。

1.2.3 卵丘细胞线粒体的提取 取经 80 IU/mL 透明质酸酶处理后的 12 月龄雌性小鼠卵丘细胞,以含 10% SSS 的 mHIF 培养液洗涤后,计数卵丘细胞,密度不少于 10⁶/mL,然后置小容量玻璃匀浆器中,匀浆处理 4~6 次,在 4 °C 冷冻离心机 2 000 g 离心 20 min,取上 2/3 上清液,以 10 000 g 离心 20 min,弃上清,沉淀的线粒体以含 10% SSS 的 mHIF 培养液悬浮并置 4 °C 冰箱中备用^[1]。

1.2.4 ICSI 及 MIT 设置显微操作仪热板温度为 32 °C^[3],操作液滴为含 10% SSS,3% 蔗糖的 mHIF 培养液^[4]。对 C 组卵母细胞,于 ICSI 操作皿的 PVP 液滴中制动精子,先尾后头吸入精子,然后从线粒体液滴中,在精子前端吸入约一个卵母细胞直径长度的线粒体悬液。用持卵针固定卵母细胞,使其第一极体位于 12 点钟或 6 点钟位置,将注射针于 3 点钟位置刺向 9 点钟位置,在针尖到达左 1/3 直径处时,停止刺入,回吸少量胞浆确认卵质膜已破,缓缓注入线粒体悬液及精子,并吸吐 1~2 次,使线粒体与胞浆混匀,以防止精子被包围在线粒体液泡中而不利于受精^[1]。注射完毕后的卵母细胞移入含 10% SSS 的 HIF 培养液中培养。对 A、B 两组卵母细胞,除以培养液代替线粒体悬液外,其他操作与 C 组相同。

1.2.5 注射后卵母细胞的培养及观察 在 ICSI 及 MIT 或培养液空注 6 h 后观察卵母细胞受精情况,并将受精后的胚胎移入含 10% SSS 的 P1 培养液中继续培养,此后每隔 24 h 观察一次胚胎发育情况,并分别取二细胞期、四细胞期、八细胞期胚胎以及桑椹胚和囊胚进行染色。

1.2.6 $\Delta\Psi_m$ 的分析 按照 $\Delta\Psi_m$ 检测试剂盒说明书配制 JC-1 染色工作液。染色前先将其置于 37 °C 培养箱中预热 30 min,再将 JC-1 染色工作液按照 1:1 的比例加入含有胚胎的培养液中,并于 37 °C,5% CO₂ 培养箱中染色 25 min,用含 10% SSS 的 mHIF 培养液冲洗胚胎数次后,在荧光显微镜下分别于绿色荧光模块和红色荧光模块下观察,用 LUCIA G 软件获取图像,并分别测量同一胚胎的红色荧光和绿色荧光强度值,进而得到二者的比值。重复以上操作,对各组各阶段多枚鼠胚进行测量,比较分析 $\Delta\Psi_m$ 。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 11.0 软件包对数据资

料根据情况分别进行方差分析或秩和检验。

2 结果

2.1 各阶段植入前胚胎经 JC-1 染色后可见光、绿

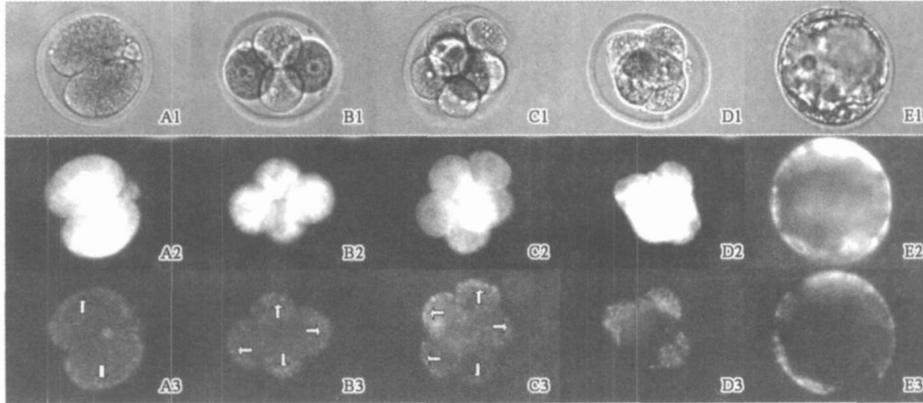


图1 各阶段植入前胚胎经 JC-1 染色后可见光、绿色荧光和红色荧光图片($\times 200$)
A1、A2、A3: 二细胞期胚胎; B1、B2、B3: 四细胞期胚胎; C1、C2、C3: 八细胞期胚胎;
D1、D2、D3: 桑椹胚; E1、E2、E3: 囊胚

Fig. 1 Images of pre-implantation embryos stained with JC-1 under a visible light, green fluorescence and red fluorescence($\times 200$)

A1, A2, A3: 2-cell stage embryo; B1, B2, B3: 4-cell stage embryo; C1, C2, C3: 8-cell stage embryo; D1, D2, D3: Morula; E1, E2, E3: Blastocyst

2.2 植入前各阶段 3 组胚胎 $\Delta\Psi_m$ 间的比较 见表 1。在二细胞期和桑椹胚期, A、C 两组胚胎 $\Delta\Psi_m$ 均高于 B 组 ($P < 0.01$), 且 A 组高于 C 组 ($P < 0.01$); 在四细胞期, A、C 两组胚胎 $\Delta\Psi_m$ 均高于 B

色荧光和红色荧光结果 见图 1。胞浆内高 $\Delta\Psi_m$ 与低 $\Delta\Psi_m$ 分布特点各有不同, 其中卵裂期胚胎中, 高 $\Delta\Psi_m$ 大部分集中在卵裂球胞浆的边缘部分(图中箭头所示), 而在卵裂球之间相邻的区域极少分布。

组 ($P < 0.05$) 而 A、C 两组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 在八细胞期和囊胚期, A、C 两组胚胎 $\Delta\Psi_m$ 均高于 B 组 ($P < 0.05$) 且 A 组亦高于 C 组 ($P < 0.05$)。

表 1 3 组小鼠植入前胚胎各阶段红、绿荧光强度比值 ($\bar{x} \pm s$)

组别	二细胞期		四细胞期		八细胞期		桑椹胚		囊胚	
	胚胎数	荧光强度比值	胚胎数	荧光强度比值	胚胎数	荧光强度比值	胚胎数	荧光强度比值	胚胎数	荧光强度比值
A	26	0.4534 \pm 0.0518	20	0.4386 \pm 0.0568	15	0.4619 \pm 0.0349	13	0.6784 \pm 0.0226 Δ	12	0.8424 \pm 0.0251 Δ
B	23	0.2640 \pm 0.0455**	19	0.2484 \pm 0.0337*	13	0.2281 \pm 0.0128*	12	0.3815 \pm 0.0262** Δ	11	0.5207 \pm 0.0664* Δ
C	19	0.4068 \pm 0.0336**##	17	0.4025 \pm 0.0611#	14	0.4047 \pm 0.0213**	13	0.5647 \pm 0.0202**## Δ	11	0.7126 \pm 0.0233** Δ

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs A 组; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs B 组; $\Delta P < 0.05$ vs 二细胞期

2.3 3 组胚胎植入前各阶段 $\Delta\Psi_m$ 变化趋势的比较 见表 1。3 组桑椹胚和囊胚 $\Delta\Psi_m$ 分别高于二细胞期、四细胞期和八细胞期胚胎 ($P < 0.05$), 前两者间以及后 3 者间差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

在人类辅助生殖技术领域中, 老龄患者胚胎的低发育潜能问题一直是困扰生殖医学专家的难题。线粒体功能是反映细胞活性的重要指标, 研究表明^[5], 随着女性年龄的增长, 其卵母细胞及胚胎细胞的线粒体也相应地出现功能异常、数目减少及活性降低。而 van Blerkom 等^[6]发现, MIT 可明显提高受体卵母细胞内的 ATP 含量, 并且新移入的线粒体可

存活 80 小时以上。 $\Delta\Psi_m$ 通过线粒体内膜两侧“质子泵”的作用形成, 从而保证电子传递以及氧化磷酸化反应的正常进行, 以促进细胞能量物质 ATP 的形成。本研究结果显示, 经过 MIT 的老年小鼠卵母细胞形成胚胎后, 从二细胞期到囊胚期各阶段 $\Delta\Psi_m$ 较未行 MIT 组均有明显提高 ($P < 0.05$)。分析原因可能是新移入的线粒体具有较高 $\Delta\Psi_m$ 并可以一直维持至囊胚期, 或者线粒体数目上的增多使得细胞内总体 $\Delta\Psi_m$ 有所提高。此外, 本研究结果还显示, MIT 后二细胞期和桑椹胚期胚胎 $\Delta\Psi_m$ 的提高较其他阶段更明显 ($P < 0.01$), 这可能与这两阶段的特殊性有关。小鼠胚胎基因组的激活发生在二细胞期, 而桑椹胚期又是胚胎从低耗氧到高耗氧状态的转折点^[7], 此两种变化都与胚胎新陈代谢效率的提

高密切相关,在这种情况下可能更多新注入的线粒体被激活,从而引起 $\Delta\Psi_m$ 大幅度升高。

植入前胚胎在卵裂球紧密化之前一直保持低氧消耗状态,直到桑椹胚期氧消耗明显升高^[7],并开始利用葡萄糖^[8],由于在囊胚期之前胚胎内的线粒体都不会发生复制^[9],所以为了满足细胞生理活动的需求,一些原来处于静止状态的线粒体会被激活,表现为 $\Delta\Psi_m$ 的升高。本研究中,3组胚胎表现出相同的一种 $\Delta\Psi_m$ 变化趋势,即从二细胞期到八细胞期经历一段较低的水平,然后在桑椹胚期出现明显升高,在囊胚期达到最大值。这种变化趋势与胚胎在不同阶段的不同生理生化特征是相对应的,而MIT组胚胎也经历了桑椹胚期 $\Delta\Psi_m$ 的明显升高,表明新移入的线粒体也成功地参与了这种胚胎的自我调控过程。

$\Delta\Psi_m$ 在卵裂期胚胎各卵裂球中的分布是不均匀的。Diaz等^[10]最先以四细胞期胚胎为研究对象,发现 $\Delta\Psi_m$ 较高的线粒体,即JC-1聚合物(J-aggregates)大部分集中在卵裂球的边缘部分,而在卵裂球之间相邻的区域极少分布,并分析这一现象可能与调节 Ca^{2+} 的信号转导作用或维持一些 Ca^{2+} 敏感因子有关。不久后Van Blerkom等^[11]发现,在所有卵裂期小鼠胚胎中均存在这一现象。本研究结果显示,经过MIT后获得的老年小鼠分裂期胚胎仍具有以上特性,提示MIT对于老年小鼠卵裂期胚胎中 $\Delta\Psi_m$ 的分布无明显影响。

综上所述,MIT可以明显提高小鼠植入前胚胎各阶段的 $\Delta\Psi_m$ 且不对其变化趋势和分布状况产生影响,从而提高胚胎发育潜能。

参考文献:

[1] 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]. 中华妇产科学杂志, 2004, 39(2): 105-107.

- [2] 孔令红,刘忠,李红,等. 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: 990-991.
- [3] 李明,严阿勇,姚慧,等. 利用卵胞浆精子注射(ICSI)技术生产转基因小鼠[J]. 生物工程学报, 2006, 22(5): 784-788.
- [4] 严阿勇,李明,安晓荣,等. 胞浆内精子注射技术生产小鼠[J]. 生物工程学报, 2005, 21(2): 305-310.
- [5] Steuerwald N, Barritt J A, Adler R, et al. Quantification of mtDNA in single oocytes polar bodies and subcellular components by real-time rapid cycle fluorescence monitored PCR[J]. Zygote, 2000, 8: 209-215.
- [6] van Blerkom J, Sinclair J, Davis P. Mitochondrial transfer between oocytes: Potential applications of mitochondrial donation and the issue of heteroplasmy[J]. Hum Reprod, 1998, 13: 2857-2868.
- [7] Trimarchi J R, Liu L, Porterfield D M, et al. Oxidative phosphorylation-dependent and -independent oxygen consumption by individual preimplantation mouse embryos[J]. Biol Reprod, 2000, 62: 1866-1874.
- [8] Gardner D K. Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture[J]. Theriogenology, 1998, 49: 83-102.
- [9] Jansen R P, de Boer K. The bottleneck: Mitochondrial imperatives in oogenesis and ovarian follicular fate[J]. Mol Cell Endocrinol, 1998, 145: 81-88.
- [10] 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]. J Cell Sci, 1999, 112: 1077-1084.
- [11] 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]. Hum Reprod, 2002, 17: 393-406.

(编辑:刘霞)