

卵母细胞老化对小鼠体细胞克隆胚发育的影响

王二耀^{1,2}, 代相鹏^{1,2}, 焦丽红¹, 周琪¹, 王柳¹

1. 中国科学院动物研究所计划生育生殖生物学国家重点实验室, 北京 100080

2. 中国科学院研究生院生物系, 北京 100039

[摘要] 就小鼠卵母细胞的卵龄对克隆胚的体外发育能力的影响进行了检测, 以确定最佳的取卵时间, 以及取卵后进行核移植操作的可耐受的时间。采用 PMSG 和 hCG 超排 B6D2F1 雌鼠。在体内老化实验中, 分别于注射 hCG 后 13, 15, 17, 20 h 取卵用于核移植操作; 在体外老化实验中, 所有的卵均于注射 hCG 后 13 h 取出并培养, 然后在 13, 15, 17, 20 h 进行核移植操作。每个时间点的核移植操作在 1 h 内完成, 重构的胚胎培养 1 h 后进行激活。结果显示: 在体内老化实验中, 注射 hCG 后 13 h 取卵, 获得的克隆囊胚发育率最高, 为 56.0%, 15 h 取卵仍维持了其支持胚胎体外发育的能力, 但 17 h 及更长时间后取的卵, 重构后的囊胚发育率显著下降 (18.1%)。注射 hCG 后 15 h 取的卵孤雌发育率最高 (囊胚发育率为 90.1%), 并在 17 h 仍维持较高的孤雌发育能力, 在 20 h 显著下降。在体外老化试验中, 于注射 hCG 后 13 h 取卵, 分别于 13, 15, 17 h 重构, 都获得了较高的囊胚发育率 (分别为 57.7%, 52.2%, 46.3%), 而在注射 hCG 后 20 h 重构, 囊胚发育率显著下降 (14.8%)。体外老化的孤雌胚在注射 hCG 后 22 h 激活时囊胚发育率显著下降。结果表明: 卵母细胞在体内和体外老化都影响克隆胚的体外发育, 最佳取卵时间为注射 hCG 后 13 h, 取卵后立即用于重构可获得最佳囊胚发育率; 体内、外老化卵支持重构胚较好发育的时间间隔是不同的, 体内老化卵支持重构胚发育能力从注射 hCG 后 17 h 开始下降, 体外老化卵则发生在 20 h。这些结果可以指导操作, 有利于在应用核移植进行其他基础研究时降低操作引起的误差。

[关键词] 小鼠; 核移植; 卵母细胞; 老化

[中图分类号] Q 987, Q 813

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-7857(2007)03-0028-06

Effects of Postovulatory Aging of Mouse Oocytes on Development of Mouse Somatic Cell Cloned Embryos in vitro

WANG Eryao^{1,2}, DAI Xiangpeng^{1,2}, JIAO Lihong¹, ZHOU Qi¹, WANG Liu¹

1. State Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China

2. Department of Biology, Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

Abstract: The study analyzed the effects of postovulatory aging of mouse oocytes, both in vivo and in vitro, on the development of mouse somatic cell nuclear transfer embryos in vitro. Oocytes were collected from female B6D2F1 mice 13, 15, 17, 20 hours after hCG injection, respectively. Nuclear transfer micromanipulation was completed within one hour, and the reconstructed embryos were activated after one hour. At the same time, the parthenogenesis development was compared. For in vitro aging experiment, all oocytes were collected 13 hours after hCG injection, then nuclear transfer was performed 13, 15, 17, 20 hours after hCG injection. The results showed that the postovulatory aging of oocytes both in vivo and in vitro affected the development of the cloned embryos in vitro. The cloned blastocyst rate reached the highest when oocytes were collected 13 hours after hCG injection and being micromanipulated at once. The cloned blastocyst rate significantly decreased when oocytes were collected 17 hours after hCG injection and when oocytes were collected 13 hours after hCG injection and being micromanipulated 20 hours after hCG injection.

收稿日期: 2006-11-07

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30300176, 30400232), 国家自然科学基金国际合作重点项目

作者简介: 王二耀, 男, 北京市海淀区北四环西路 25 号中国科学院动物研究所计划生育生殖生物学国家重点实验室, 博士生, 主要从事动物克隆研究; E-mail: erylao@yahoo.com

王柳 (通讯作者), 女, 北京市海淀区北四环西路 25 号中国科学院动物研究所计划生育生殖生物学国家重点实验室, 副研究员, 主要从事动物克隆与胚胎干细胞研究; E-mail: wangliu@oz.ac.cn

These results provide us with some practicable nuclear transfer procedure rules for cloning to achieve better results and reduce the error by manipulation when nuclear transfer is used in the fundamental researches.

Key Words: mouse; nuclear transfer; oocyte; aging

CLC Numbers: Q 987, Q 813

Document Code: A

Article ID: 1000-7857(2007)03-0028-06

0 引言

在动物排卵后,精子入卵有一个时期限制,如在这一时期发生入卵,则卵母细胞的活化及发育能力可达到最佳。小鼠的这一时期可能持续 6 h^[1]。在核移植研究中,以卵母细胞作受体进行核移植,体外操作的卵母细胞或许也存在这样的时间限制。明确最佳取卵时间及操作时间,将有助于指导核移植过程中的实际操作,提高核移植操作的效率和重构胚的发育。

在正常受精的情况下,精子诱导一系列钙振荡,启动了一系列分子和细胞事件,从而开始了胚胎的发育进程^[2]。卵母细胞任何异常变化,都会影响发育,比如老化。就核移植操作而言,卵母细胞可在以下两种情况发生老化:一种是排卵后在不同时间点取卵,即卵母细胞在体内处于一种等待状态,随取卵时间向后推移,卵母细胞逐渐老化;另一种情况是取卵后在体外培养,于不同的时间进行操作或激活处理,卵母细胞随体外培养时间的延长逐渐老化。已有试验表明,卵母细胞排出后在体内和体外不同程度的老化都影响其受精及孤雌激活的能力^[3],但卵母细胞老化对体细胞的重编程能力的影响未见系统分析。确定排卵后卵母细胞重编程能力的最佳时间点与维持这种能力的时间间隔,以及比较与孤雌发育能力的差异,对实际操作具有指导意义,有利于降低试验误差,有助于对核移植中出现的一些异常现象加以分析,并有可能通过这种差异来研究重编程相关因子。

1 材料和方法

1.1 试验材料

所用实验动物 DBA 雄鼠和 C57BL/6 雌鼠购自北京实验动物中心。B6D2F1(C57BL/6*DBA)小鼠在本实验室繁殖获得。孕马血清(PMSG)和人绒毛膜促性腺激素(hCG)购自宁波制药厂,其他试剂购自 Sigma 公司。卵母细胞去核前后的培养以及重构胚的培养所用的是 CZB-G 培养液。卵母细胞的收集及纺锤体复合体的去除所用的操作液是 Hepes-CZB 液。激活液为含 10 mmol/l SrCl₂ 和 5 μg/ml 细胞松弛素 B 的无钙 Hepes-CZB。

1.2 卵母细胞的收集和供体细胞的准备

8~16 周龄的 B6D2F1 的雌鼠每只腹腔注射 10 IU 的 PMSG,48 h 后腹腔注射 10 IU hCG。在注射 hCG 13 h 后断颈处死,取卵用于体外老化试验(见试验设计),或注射 hCG 后不同时间点取卵用于体内老化试验(见试

验设计)。在获得卵丘卵母细胞复合体之后,用含有 0.1%(w/v) 的透明质酸酶的 Hepes-CZB 溶液消化 3 min,使颗粒细胞分散,脱掉卵丘细胞的卵母细胞在 Hepes-CZB 溶液中洗 3 遍后放入 CZB 溶液中,于 37 5% CO₂ 的空气中培养备用。颗粒细胞在 M2 溶液中洗 2 遍以去除透明质酸酶,4 保存在 M2 液中备用。使用时,挑选直径为 10~12 μm、圆形、细胞膜完整的颗粒细胞作为供体。

1.3 卵母细胞纺锤体复合体的去除和重构

卵母细胞纺锤体复合体的去除(称为去核)及重构操作在配有 DIC 的 NIKON 显微镜下进行。显微操作器为 Nikon-Narishige(MO-188, Tokyo, Japan)。卵母细胞放入含 5 μg/ml 细胞松弛素 B 的 Hepes-CZB 液中,转动卵母细胞使 M 期染色体中期板清晰。用平口针借助压电陶瓷(Piezo, Prim 1500)脉冲在染色体位置的透明带上开一洞。退出针,然后吸取颗粒细胞,反复吹出吸入颗粒细胞使其质膜破裂,使细胞核刚好位于注射针管口,通过去核时透明带上的洞,注射针深入卵胞质内,给一小的 Piezo 脉冲,使卵母细胞质膜破开,然后注入颗粒细胞核,退针时吸出纺锤体复合体,同时带出很少量的胞质。将重构好的卵母细胞放入 CZB-G 培养液中培养 1 h,以待活化处理。

1.4 重构胚和卵母细胞的激活处理

卵母细胞的孤雌活化和重构胚的激活都使用含有 10 mmol/l 氯化铯和 5 μg/ml 细胞松弛素的无钙 CZB 液处理 6 h。活化处理后,具有明显类原核结构的胚胎记为已活化胚胎,培养于 CZB-G 液中观察体外发育。

1.5 试验设计

试验 1 体外老化试验。

在注射 hCG 后 13 h 取卵,卵母细胞培养在 CZB-G 培养液中并分成 4 组,第一组立即用于核移植操作(13 h 组),第 2~4 组分别在注射 hCG 后 15, 17, 19 h 进行重构操作。对这些组的重构胚的激活率和体外发育率进行比较。

试验 2 体内老化试验。

分别在注射 hCG 后 13, 15, 17, 20 h 进行取卵,取卵后立即进行核移植操作。对这些组的重构胚的激活率和体外发育率进行比较。

每个试验组操作 1 h,之后放入 CZB-G 培养液中培养 1 h,然后激活处理,同时取卵母细胞进行孤雌激活。

1.6 统计分析

试验重复 3 次, 结果用卡方检验分析, $P < 0.05$ 记为差异显著。

2 试验结果与分析

2.1 卵母细胞体内老化对胚胎发育的影响

在注射 hCG 后不同的时间点取卵, 尽管克隆胚的激活率随着时间的延长有降低的趋势, 但没有统计上的显著性差异(见表 1)。在 20 h 取卵, 2 细胞发育率显著下降。在 13 h 取卵, 克隆囊胚的发育率最高, 为 56.0%, 在 15 h 取卵, 也得到了较高的囊胚发育率(52.9%), 并与 13 h 取卵无显著差异。13, 15 h 取卵, 都显著高于 17 和 20 h(分别为 18.1%和 8.2%)。在 17 h 取卵, 激活率和 2 细胞发育率与 13, 15 h 无显著差异, 但囊胚率大大降

低。20 h 取卵, 尽管仍维持了较高的激活率(88.5%), 但以后 2 细胞发育率就下降, 仅 8.2%的重构胚可以发育到囊胚。结果表明, 在 13 h 和 15 h 取卵, 卵母细胞对体细胞的重编程能力强, 尤其在 13 h 的卵母细胞支持重构胚体外发育能力最高。而超过 15 h 取卵, 这种支持重构胚发育能力大大下降。它们都显著高于 17 h 和 20 h(分别为 18.1%和 8.2%)。在 17 h 取卵, 激活率和 2 细胞发育率与 13, 15 h 无差异, 但囊胚率大大降低。20 h 取卵, 尽管仍维持了较高的激活率(88.5%), 但从此 2 细胞发育率下降, 仅 8.2%的重构胚可以发育至囊胚。也就是说, 在 13 h 和 15 h 取卵, 卵母细胞对体细胞的重编程能力强, 尤其在 13 h 的卵母细胞支持重构胚体外发育能力最高。超过 15 h 取卵, 这种重编程能力大大下降。

表 1 卵母细胞体内老化对克隆胚发育的影响

Table 1 Effects of postovulatory aging of mouse oocytes on development of mouse somatic cell cloned

取卵时间 / h phCG	操作卵数	激活数(激活率/%)	2 细胞发育数 (2 细胞发育率/%)	桑椹胚发育数 (桑椹胚发育率/%)	囊胚数 (囊胚率/%)
13	91	85 (93.4)	75 (82.4) ^a	55 (60.4) ^a	51 (56.0) ^a
15	102	96 (94.1)	78 (76.5) ^a	61 (59.8) ^a	54 (52.9) ^a
17	99	91 (91.9)	80 (80.8) ^a	20 (20.2) ^b	18 (18.1) ^b
20	61	54 (88.5)	40 (65.6) ^b	8 (13.1) ^b	5 (8.2) ^c

注: 同列中上角字母不同则表示差异显著($P < 0.05$), 数据使用卡方检验分析。

在注射 hCG 后不同的时间取卵, 在培养液中培养 2 h 后进行孤雌激活, 孤雌胚激活率和 2 细胞发育率没有显著差异。在 15 h 取卵, 囊胚发育率最高, 为 90.1%; 其次是在 13 h 取卵, 为 86.2%, 二者未见显著差异; 在 17 h 取卵, 囊胚发育率为 79.3%, 与 13 h 取卵没有差异, 但显著低于 15 h。这 3 个时间点的情形都显著高于 20 h 囊胚发育率(46.1%)。在 20 h 取卵, 尽管激活率和 2 细胞发育率都很高, 但孤雌囊胚的发育能力下降(见表 2)。

2.2 卵母细胞体外老化对胚胎发育的影响

在注射 hCG 后 13 h 取卵, 然后在不同时间点进行重构操作, 所获克隆胚的激活率无显著性差异, 2 细胞

发育率在 20 h 显著降低, 为 69.1%, 显著低于 13, 15, 17 h 重构卵, 分别为 84.6%, 81.7%, 80.0%。而对于囊胚发育率, 在 13 h 重构最高, 为 57.7%, 在 15 h 重构, 也得到了较高的囊胚发育率(52.2%), 并与 13 h 重构没有统计差异。但在 17 h 重构, 囊胚发育率(46.3%)显著低于 13 h 重构(57.7%), 而与 15 h 重构(52.2%)没有显著差异。结果表明, 在 13, 15, 17 h 重构, 都获得了较高的囊胚发育率, 以 13 h 的卵母细胞支持重构胚体外发育能力最高。而在 20 h 重构, 这种支持重构胚发育的能力大大下降, 囊胚率仅为 14.8%, 显著低于其他时间点重构胚的囊胚发育率(见表 3)。

在注射 hCG 后 13 h 取卵, 在体外培养, 然后在在

表 2 卵母细胞体内老化对孤雌胚发育的影响

Table 2 Effects of postovulatory aging of mouse oocytes on development of mouse parthenogenesis embryos

取卵时间/ h phCG	激活时间/h	操作卵数	激活数 (激活率/%)	2 细胞发育数 (2 细胞发育率/%)	桑椹胚发育数 (桑椹胚发育率/%)	囊胚数 (囊胚率/%)
13	15	65	63 (96.9)	62 (95.4)	57 (87.7) ^{ab}	56 (86.2) ^{ab}
15	17	71	69 (97.2)	69 (97.2)	65 (91.5) ^a	64 (90.1) ^a
17	19	82	81 (98.8)	80 (97.6)	66 (80.5) ^b	65 (79.3) ^b
20	22	76	75 (98.7)	73 (96.1)	45 (59.2) ^c	35 (46.1) ^c

注: 同列中上角字母不同则表示差异显著($P < 0.05$), 数据使用卡方检验分析。

表 3 卵母细胞体外老化对克隆胚发育的影响

Table 3 Effects of aging of mouse oocytes in vitro on development of mouse somatic cell cloned embryos

操作时间/h	操作卵数	激活数(激活率/%)	2 细胞发育数 (2 细胞发育率/%)	桑椹胚数 (桑椹胚率/%)	囊胚数 (囊胚率/%)
113	123	114 (92.7)	104 (84.6) ^a	76 (61.7) ^a	71 (57.7) ^a
15	115	107 (93.0)	94 (81.7) ^a	70 (60.8) ^a	60 (52.2) ^{ab}
17	95	86 (90.5)	76 (80.0) ^a	54 (56.8) ^a	44 (46.3) ^b
20	81	72 (88.9)	56 (69.1) ^b	19 (23.5) ^b	12 (14.8) ^c

注: 同列中上角字母不同则表示差异显著($P<0.05$), 数据使用卡方检验分析。

同的时间点进行孤雌激活, 孤雌胚都获得了较高的激活率, 但 2 细胞发育率在 22 h 激活出现显著下降。在 17 h 激活囊胚发育率最高, 为 92.0%, 但与 15, 19 h 相比未见显著差异。在 22 h 激活, 仍然获得了较好的囊胚发育率, 达 61.5%, 显著高于 24 h 激活, 但显著低于其他时间激活后的囊胚发育率。结果表明, 直到 22 h 后卵母细胞体外老化, 才较显著地影响孤雌胚的囊胚发育率(见表 4)。

表 4 卵母细胞体外老化对孤雌胚发育的影响

Table 4 Effects of aging of mouse oocytes in vitro on development of mouse parthenogenesis embryos

激活时 间/h	操作 卵数	激活数 (激活 率/%)	2 细胞 (2 细胞 发育率/%)	桑椹胚 (桑椹 胚率/%)	囊胚 (囊胚 率/%)
15	65	63 (96.9)	62 (95.4) ^a	57 (87.7) ^a	56 (86.2) ^a
17	75	72 (96.0)	72 (96) ^a	70 (93.3) ^a	69 (92.0) ^a
19	79	75 (94.9)	73 (92.4) ^a	73 (92.4) ^a	72 (91.1) ^a
22	78	71 (91.0)	62 (79.5) ^b	52 (66.7) ^b	48 (61.5) ^b
24	69	63 (91.3)	33 (47.8) ^c	21 (30.4) ^c	13 (18.8) ^c

注: 同列中上角字母不同则表示差异显著($P<0.05$), 数据使用卡方检验分析。

3 讨论

老化卵和未老化卵在受精或者激活后其发育能力是不同的。排卵后的老化卵, 受精后胚胎发育能力下降, 小鼠排卵后 12 h 再受精, 则发育能力下降, 合子形态异常并出现碎裂^[4]。免疫荧光分析发现, 老化卵在未受精时就表现出异常形态, 如减数分裂纺锤体上微丝密集区域消失、纺锤体异常、染色质组装异常等^[5]。这些形态的变化可能与 MPF 和 MAPK 水平的下降有关。本研究发现在体内老化时, 注射 hCG 后 13 h 取卵, 囊胚发育率最高, 为 56.0%, 15 h 取卵仍维持了这种重编程能力, 但从 17 h 取卵开始, 囊胚发育率显著下降(18.1%)(见表 1)。在体外老化试验中, 于注射 hCG 后 13 h 取卵, 然后进行体外培养, 并分别于 13, 15, 17 h 重构, 都获得了较高的囊胚发育率(分别为 57.7%, 52.2%, 46.3%), 而在 20 h 重构, 囊胚发育率显著下降(14.8%)

(见表 3)。说明随着体内、外老化时间的延长, 卵母细胞支持克隆胚胎发育的能力下降。

另有试验表明, MPF 和 MAPK 水平的下降在体内比体外快^[6,7]。本研究发现注射 hCG 后 17 h 取卵, 卵的质量开始下降, 体外老化卵则发生在 20 h。因为活性 MPF 可以诱导核膜破裂、染色质致密化和微管组装相关的多种蛋白的磷酸化, 并与卵的重编程能力有关^[8]。小鼠卵母细胞自卵巢排出后的一定时间范围内, 随着时间的延长, 卵对激活刺激的敏感性逐渐增加, 这可能是导致随着卵龄的增加卵母细胞的激活率提高的原因。卵子的过度老化会出现一定比例的自发激活^[9], 牛也有类似的自发激活^[10], 但这种自发激活会使后续发育能力下降。本研究中, 体内老化随时间的延长, 激活率有升高的趋势, 但未见显著差异。体外老化卵都获得了较高的激活率。体内老化卵以 15 h 取卵的孤雌发育率最高(囊胚发育率为 90.1%), 并在 17 h 仍维持较高的孤雌发育能力, 在 20 h 取卵显著下降(见表 2)。体外老化卵的孤雌发育在 22 h 激活时囊胚发育率显著下降(见表 4)。表明过度老化卵的孤雌发育能力也下降, 而且体外老化下降慢一些。但孤雌发育所允许的时间间隔比克隆胚长, 即克隆胚受卵母细胞老化的影响更大。

在老化卵中, 精子也可以启动钙振荡, 但与正常卵有所不同^[11,12], 如受精后或者激活后频率变慢、幅度下降、持续时间变短。老化过程中, ATP 的下降及 Bcl-2(一种抗凋亡的蛋白)表达的下降可能影响了 Ca^{2+} -ATPase 泵的功能, 从而影响了内质网中钙的重积聚^[13]。首次钙升高就消耗了大量内质网中的钙, 而钙不能被及时补充, 这种低浓度的内质网钙在体细胞中是促进细胞死亡的原因^[14,15]。在核移植后激活时及孤雌激活时, 也需要钙振荡来引发一系列信号转导事件, 但在老化过程中, 这种改变了的钙振荡可能导致了卵的发育能力下降。

另外, 一些重要的抗凋亡分子在老化的过程中失活了或者降解了, 可能是由于 MPF 和 MAPK 水平的下降促进了这些分子的降解, 因为在体细胞中 MPF 和 MAPK 的下降, 促使 Bcl-2 和其他抗凋亡的蛋白的降解^[16]。在一些情况下, 未受精的老化卵会丧失发育能力, 其他老化卵受精后可以启动发育, 一些存活的胚胎表现

出生缺陷^[17-20]。在克隆研究中这种情况也有可能发生。

还有一种情况是老化卵中的一些凋亡蛋白得到活化^[21],来源于老化卵的合子发育能力下降,表现出程序性细胞死亡或凋亡现象^[3]。即使未受精的卵,在体外延长培养时,用 TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase (TdT) nick-end labelling) 检测时,也会发现凋亡现象的发生^[18]。凋亡的发生需要一些特殊基因的活化和表达。小鼠卵母细胞表达一些负责细胞解体的蛋白酶,如抗凋亡和促凋亡的 Bcl-2 家族成员^[22]。这些基因产物的量和比例的变化可能造成了老化卵的死亡^[23,3]。

老化卵受精后或者激活后发育能力的下降与线粒体的功能异常关系也很大,线粒体不仅是动力工厂,还含有重要的促进凋亡和抗凋亡成分^[24],因而破坏线粒体膜或者改变其产生 ATP 的能力可能影响细胞的发育。研究表明随着培养时间的延长,小鼠卵细胞的 ATP 含量持续下降^[25],而且还发现人卵中这种胞内 ATP 的浓度与胚胎发育能力关系密切^[26]。人类辅助生殖的胞质移植中,可育的供卵的胞质被移入不育的受体卵胞质中,可使受体卵获得受精和进一步发育的能力^[27]。导入的新鲜的线粒体发生了作用被认为是其原因之一。

体内和体外卵母细胞老化都会影响克隆胚的体外发育,这些结果为我们进行核移植研究提供了重要的参考依据,并有利于核移植研究时降低误差。老化后卵的成分到底发生了何种变化,这种变化是如何引起发育能力的下降及凋亡的发生,尚需深入研究。

4 结论

卵母细胞无论在体内还是体外老化都会影响克隆胚的体外发育。在注射 hCG 后 13 h 取卵并立即进行核移植,重构胚的发育率最佳。在体内和体外老化卵支持重构胚发育的时间间隔是不同的,体内老化卵支持重构胚发育能力的下降发生在 17 h,体外老化卵则发生在 20 h。

参考文献 (References)

- [1] BRADEN A W, AUSTIN C R. The fertile life of mouse and rat eggs[J]. Science, 1954, 120: 610- 611.
- [2] MIYAZAKI S, SHIRAKAWA H, NAKADA K, et al. Essential role of the inositol 1,4,5- triphosphate receptor/Ca²⁺ release channel in Ca²⁺ waves and Ca²⁺ oscillations at fertilization of mammalian eggs[J]. Develop Biol, 1993, 158: 62- 78.
- [3] MORITA Y, TILLY J L. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass[J]. Develop Biol, 1999, 213: 1- 17.
- [4] MARSTON J H, CHANG M C. The fertilizable life of ova and their morphology following delayed insemination in mature and immature mice [J]. J Exp Zool, 1964, 155: 237- 252.
- [5] WEBB M, HOWLETT S K, MARO B. Parthenogenesis and cytoskeletal organization in aging mouse eggs[J]. J Emb Exp Mor, 1986, 95: 131- 145.
- [6] XU ZHE, ABBOTT A, KOPF G S, et al. Spontaneous activation of ovulated mouse eggs: time - dependent effects on M - phase exit, cortical granule exocytosis, maternal messenger ribonucleic acid recruitment, and inositol 1,4,5 - triphosphate sensitivity [J]. Biol Reprod, 1997, 57: 743- 750.
- [7] ABBOTT A L, XU ZHE, KOPF G S, et al. In vitro culture retards spontaneous activation of cell cycle progression and cortical granule exocytosis that normally occur in vivo unfertilized mouse eggs [J]. Biol Reprod, 1998, 59: 1515- 1521.
- [8] MACHATY Z, PRATHER R S. Strategies for activating nuclear transfer oocytes [J]. Reprod Fertil Dev, 1998, 10: 599- 613.
- [9] HAGEN D R, PRATHER R S, FIRST N L. Response of porcine oocytes to electrical and chemical activation during maturation in vitro [J]. Mol Reprod Develop, 1991, 28: 70- 73.
- [10] KING W A, XU K P, SIRARD M A, et al. Cytogenetic study of parthenogenetically activation bovine oocytes matured in vivo and in vitro [J]. Gamete Res, 1988, 20: 265- 274.
- [11] JONES K T, WHITTINGHAM D G. A comparison of sperm- and IP3- induced Ca²⁺ release in activated and aging oocytes[J]. Develop Biol, 1996, 178: 229- 237.
- [12] IGARASHI H, TAKAHASHI E, HIROI M, et al. Aging - related changes in calcium oscillations in fertilized mouse oocytes[J]. Mol Reprod Develop, 1997, 48: 383- 390.
- [13] GORDO A C, KUOKAWA M, WU H, et al. Modifications of the Ca²⁺ release mechanisms of mouse eggs by fertilization and by the sperm factor [J]. Mol Human Reprod, 2002, 8: 619- 629.
- [14] JIANG S, CHOW S C, NICOTERA P, et al. Intracellular Ca²⁺ signals activate apoptosis in thymocytes: studies using the Ca²⁺- ATPase inhibitor thapsigargin [J]. Exp Cell Res, 1994, 212: 84- 92.
- [15] BIAN X, HUGHES Jr F M, HUANG Y, et al. Roles of cytoplasmic Ca²⁺ and intracellular Ca²⁺ stores in induction and suppression of apoptosis in S49 cells [J]. Am J Physiol, 1997, 272: 1241- 1249.
- [16] BOUCHER M J, MORISSET J, VACHON P H, et al. MEK/ERK signaling pathway regulates the expression of Bcl-2, Bcl- X(L), and Mcl- 1 and promotes survival of human pancreatic cancer cells [J]. J Cell Biochem, 2000, 79: 355- 369.
- [17] TARIN J J, PEREZ- ALBALA S, AGUILAR A, et al. Long-term effects of postovulatory aging of mouse oocytes on offspring: A two - generational study [J]. Biol Reprod,

- 1999, 61: 1347- 1355.
- [18] TAKASE K, ISHIKAWA M, HOSHIAI H. Apoptosis in the degeneration process of unfertilized mouse ova [J]. Tohoku J Exp Med, 1995, 175: 69- 76.
- [19] FUJINO Y, OZAKI K, YAMAMASU S, et al. DNA fragmentation of oocytes in aged mice [J]. Human Reprod, 1996, 11: 1480- 1483.
- [20] TARIN J J, TEN J, VENDRELL F J, et al. Dithiothreitol prevents age associated decrease in oocyte/conceptus viability in vitro[J]. Human Reprod, 1998, 13: 381- 386.
- [21] WANG Honggang, PATHAN N, ETHELL I M, et al. Ca^{2+} -induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of Bad[J]. Science, 1999, 284: 339- 343.
- [22] ADAMS J M, CORY S. The Bcl- 2 protein family: arbiters of cell survival[J]. Science, 1998, 28:1322- 1326.
- [23] BERGERON L, PEREZ G I, MACDONALD G, et al.

- Defects in regulation of apoptosis in caspase - 2 - deficient mice[J]. Genes Develop, 1998, 12:1304- 1314.
- [24] WANG X. The expanding role of the mitochondria in apoptosis[J]. Genes Develop, 2001, 15: 2922- 2933.
- [25] CHI M M, MANCHESTER J K, YANG VICTORIA C, et al. Contrast in the levels of metabolic enzymes in human and mouse ova[J]. Biol Reprod, 1988, 39: 295- 307.
- [26] VAN BLERKOM J, DAVIS P W, LEE J. ATP content of human oocytes and the developmental potential and outcome after in vitro fertilization and embryo transfer[J]. Human Reprod, 1995, 10: 415- 424.
- [27] COHEN J, SCOTT R, ALIKANI M, et al. Ooplasmic transfer in mature human oocytes [J]. Mol Human Reprod, 1998, 4: 269- 280.

(责任编辑 王 芷)

·科技智力游戏·

轻松一刻——九宫填数

该游戏的填数规则为： 在 9×9 的大九宫格内，出题者已给出若干数字，其它宫位的数字空留，需要读者根据逻辑推理填写剩下空格里的数字； 填满数字的大九宫里，数字之间的关系必须满足：每一行与每一列都有 1 到 9 的数字，每个实线所标 3×3 的小九宫格里也有 1 到 9 的数字，且每个数字在每行、每列及每个小九宫格里只能出现一次，即既不能重复也不能缺少。答案请见下期。

上期答案

九宫1 难度系数◆◆◆◆◇◇

8	7	6	9	1	5	3	4	2
5	2	1	7	4	3	6	9	8
3	4	9	2	8	6	5	7	1
4	8	5	6	9	7	1	2	3
2	1	7	3	5	4	9	8	6
6	9	3	8	2	1	7	5	4
1	5	8	4	6	9	2	3	7
7	6	4	5	3	2	8	1	9
9	3	2	1	7	8	4	6	5

九宫1 难度系数◆◆◆◆◇◇

	2			3				
		6						7
			9					
			6		5			
			8					
					3	4		
3	9			4				
5								8
				7				6

九宫2 难度系数◆◆◆◆◇◇

			4			9		
	7							
	8					2		
			2					
	9				4			
			7	8				
						7		
	5					1		
	4	6	1					5

九宫2 难度系数◆◆◆◆◇◇

6	3	8	5	1	4	7	2	9
2	9	5	3	8	7	4	1	6
7	4	1	6	9	2	5	8	3
5	7	9	2	4	1	3	6	8
1	8	4	9	3	6	2	5	7
3	2	6	8	7	5	9	4	1
9	1	3	4	5	8	6	7	2
4	6	7	1	2	3	8	9	5
8	5	2	7	6	9	1	3	4

(供稿 李建才 责任编辑 赵 佳)