

PLC ζ 对小鼠圆形精子细胞注射后卵母细胞受精及胚胎发育的影响

李冬宏*, 郭玉佳, 林晨, 陈杏婷

(福建医科大学附属第一医院生殖医学中心, 福州 350005)

【摘要】 目的 探讨 PLC ζ 作为激活剂的可行性及对 ROSI 后卵母细胞受精及胚胎发育的影响。方法 在体外构建重组质粒 pCRII-TOPO- PLC ζ , 诱导表达后采用质谱鉴定和 Western blot 检测抗原性。重组 PLC ζ 蛋白作为小鼠 ROSI 卵母细胞的激活剂, 记录受精及胚胎发育情况并统计分析。结果 成功构建了重组质粒 pCRII-TOPO- PLC ζ , 体外表达后经质谱鉴定为小鼠 PLC ζ 蛋白, 并具有良好的抗原性。重组 PLC ζ 蛋白激活卵母细胞后的受精率、2-4 细胞率、8 细胞率及成囊率与空白组之间的差异均无显著性 ($P > 0.05$)。结论 本研究中重组 PLC ζ 蛋白对卵母细胞受精及胚胎发育无显著影响, 作为小鼠 ROSI 后的卵母细胞激活剂的可行性值得商榷。

【关键词】 磷酸酯酶 C ζ ; 胚胎发育; 圆形精子细胞注射; 激活剂; 受精

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2018) 06-0793-06

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2018.06.019

Effects of PLC ζ injection into mouse round spermatid on the oocyte fertilization and embryo development

LI Donghong*, GUO Yujia, LIN Chen, CHEN Xingting

(Center of Reproductive Medicine, the Affiliated First Hospital of Fujian Medical University,
Fuzhou 350005, China)

Corresponding author: LI Donghong. E-mail: donghong3721@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the feasibility of PLC ζ as an activator and its effect on fertilization and embryo development for oocytes after mouse round spermatid injection. **Methods** The recombinant plasmid pCRII-TOPO-PLC ζ was constructed in vitro and its expression was induced. The protein was identified by mass spectrometry and the antigenicity was detected by Western blot. Recombinant PLC ζ protein was used as an activator of mouse ROSI oocytes, and fertilization and embryo development were recorded and analyzed statistically. **Results** The recombinant plasmid pCRII-TOPO-PLC ζ was successfully constructed, and the recombinant PLC ζ protein was identified by mass spectrometry and had good antigenicity. The fertilization rate, two- to four-cell rate, eight-cell rate, and cystic rate associated with the recombinant PLC ζ protein did not differ significantly from those in the blank group ($P > 0.05$). **Conclusions** The recombinant PLC ζ protein has no significant effect on oocyte fertilization and embryo development in this study. The feasibility of being an oocyte activator after mouse ROSI is questionable.

【Keywords】 PLC ζ ; embryo development; ROSI; activator; fertilization

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

[基金项目] 福建医科大学启航基金项目(2016QH038)。

Funded by Qi Hang Foundation of Fujian Medical University(2016QH038)。

[通信作者] 李冬宏(1986—)男, 硕士研究生, 研究方向: 生殖医学。Email: donghong3721@126.com

1992 年, Palermo 等^[1]成功应用卵细胞浆内单精子注射 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI) 治疗严重少弱精子症病人以来, ICSI 在治疗男性严重少弱精子症取得了重大治疗进展。随后, Devrogy 等^[2]发现有些无精子症患者的睾丸中存在少量精子, 将这些精子应用于 ICSI, 获得临床妊娠成功。然而, 仍有部分无精子症患者无法产生正常的成熟精子, 但可以从患者精液或睾丸活检标本中收集到单倍体圆形精子细胞 (round spermatid, ROS)。1994 年, Ogura 等^[3]报道了首例 ROS 受精的小鼠出生, 验证了 ROS 与成熟精子具有同样的受精和发育潜能。1995 年, Tesarik 等^[4]从无精子症患者的精液中获得圆形精子细胞, 将其注入卵子后, 成功出生了 2 名正常的婴儿。圆形精子细胞注射 (round spermatid injection, ROSI) 获得了成功, 预示着无精子症且无法产生正常成熟精子的患者也能拥有自己的遗传学后代。ROSI 技术得以迅速发展, 并且获得了一些成功案例的报道^[5-7]。但 ROSI 的受精率、妊娠率极低, 其影响主要为: 圆形精子细胞、卵母细胞激活及遗传学等因素。因此, 本研究将采用磷酸酯酶 C ζ (phospholipase C zeta, PLC ζ) 作为 ROSI 后小鼠卵母细胞激活的激活剂, 探讨 PLC ζ 作为激活剂的可行性及对 ROSI 后卵母细胞受精及胚胎发育的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

清洁级 KM 小鼠, 雄鼠 10 只, 雌鼠 30 只, 鼠龄 6~8 周, 体重 25~30 g, 购自于闽侯县吴氏实验动物贸易有限公司【SCXK (闽) 2017-0002】, 饲养于福建医科大学实验动物中心【SYXK (闽) 2017-0014】, 饲养环境湿度恒定, 温度 (24 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C, 适应性饲养一周后用于实验。本研究通过福建医科大学附属第一医院伦理委员会审批 (2016038)。

1.1.2 实验试剂

表达质粒 pCRII-TOPO (见图 1) 和人胚肾 293T 细胞 (human embryonic kidney 293T cells, HEK293T) 均购自 BioVector 质粒载体菌种细胞基因保藏中心; 琼脂糖、质粒小提试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒均购自天根生化科技有限公司; 限制性内切酶 BamH I、Xho I、TaKaRa LA Taq 酶、1 Kbp DNA Ladder Marker、T4DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司;

QIAamp DNA Mini kit 购自 QIAGEN 公司; jetPEI 转染试剂试剂盒、胎牛血清 (fetal calf serum, FCS)、培养基 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)、10% NuPAGE Bis-Tris Pre-cast Gel 试剂盒 (Invitrogen, UK) 均购自诺斯蒂克 (上海) 医疗器械有限公司。

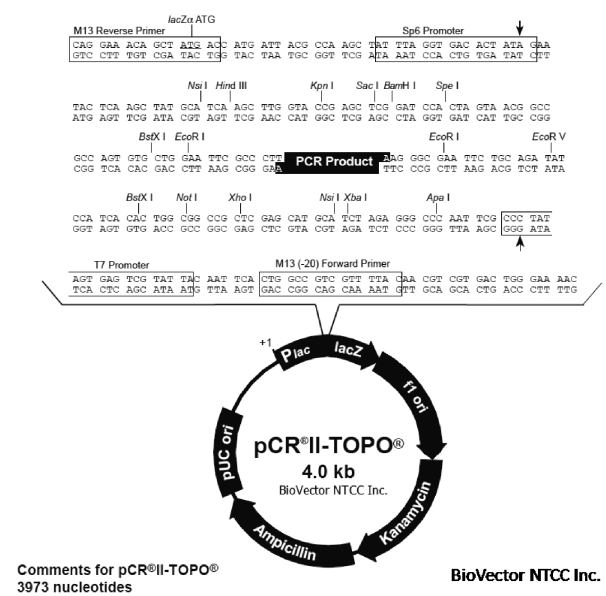


图 1 真核表达质粒 pCRII-TOPO DNA 图谱
Figure 1 The DNA map of eukaryotic expression vector pCRII-TOPO

1.2 方法

1.2.1 质粒 pCRII-TOPO- PLC ζ 的构建、体外表达与鉴定

采集新鲜的小鼠睾丸组织, 用 Trizol 法提取总 RNA 备用。根据 GenBank (NCBI Reference Sequence: NM_054066.4) 中 PLC ζ 的基因序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物, 引物序列如下: 上游引物 ATGGATCCATGGAAAGCCAAC TTCATGA; 下游引物 CGCTCGAGACTGAGAGACTT CATGTTTG。上下游引物分别加入的酶切位点为 BamH I、Xho I。其聚合酶链反应 (PCR) 的反应条件为: 预变性 95 $^{\circ}$ C 8 min、变性 95 $^{\circ}$ C 45 s、退火 55 $^{\circ}$ C 45 s、延伸 72 $^{\circ}$ C 90 s、终延伸 72 $^{\circ}$ C 5 min, 30 个循环。①采用基因重组技术构建真核表达质粒 pCRII-TOPO- PLC ζ 。②采用 jetPEI 转染试剂试剂盒将构建好的真核表达质粒转染进 HEK293T 细胞。③将转染质粒后的 HEK293T 细胞转入含有 FCS 的 DMEM 中, 并添加 4 mmol 谷氨酰胺, 100 U/mL 青霉

素和 0.1 mg/mL 链霉素,置于 5% CO₂、37℃ 培养箱培养 24 h 后,将培养液改换成不含 FCS 的 DMEM。④培养 56 h 后,收集 HEK293T 细胞;采用裂解液裂解细胞,10% NuPAGE Bis-Tris Pre-cast Gel 试剂盒 (Invitrogen, UK) 纯化重组 PLC ζ 蛋白。重组 PLC ζ 蛋白经飞行质谱蛋白质组分析系统鉴定,并用免疫印迹法 (Western blot) 评价其抗原性, -80℃ 保存备用。

1.2.2 小鼠圆形精子细胞显微注射

(1) 小鼠圆形精子细胞收集

取清洁级 6~8 周龄雄性 KM 小鼠双侧睾丸,剪碎后采用两步酶消化法制备细胞悬液,将处理好的细胞悬液用 PBS 液洗涤三次,每次 670 r/min 离心 10 min,洗涤完后弃上清,用睾丸细胞培养液混悬后待用。非连续性 Percoll 梯度法:将 Percoll 梯度液配成浓度分别为 45%、60%、90% 浓度梯度;吸取 1 mL 45% Percoll 梯度液加入 15 mL 锥形离心管中,然后再依次吸取 1 mL 60% 和 90% 的 Percoll 梯度液深入离心管管底后分次缓慢加入;最后将制好的单细胞悬液加入到密度梯度液层的最上面;室温下,2184 r/min 离心 20 min;取最佳的梯度层用 buffer 液 (1:2) 混匀;室温下,335 r/min 离心 8 min,弃上清混悬后待用。

(2) 显微注射液的制备

将收集的小鼠圆形精子细胞与上述制备的重组 PLC ζ 蛋白混合,配制成终浓度为 10×10^{-3} ng/L 的混合液为实验组;另将小鼠圆形精子细胞与 HEPES 混合为空白组。将处理好的 PLC ζ 激活剂与圆形精子细胞混合液在 ROSI 操作皿中制成微滴,其上方位置制作 HEPES 微滴,置于 37℃ 培养箱加热预平衡 1 h。

(3) 小鼠卵母细胞获取

选取清洁级 6~8 周龄 KM 雌性小鼠,至少控光 (光照 7:00 - 19:00, 黑暗 19:00 - 7:00) 饲养一周后进行促排处理;于 17:00 对小鼠进行腹腔注射 PMSG 15 IU/只,48 h 后注射 HCG 10 IU/L;注射 HCG 15 h 后,利用颈椎脱臼法处死小鼠,在腹部下侧呈“V”字型打开腹腔,找到子宫与卵巢,剪下两者之间的输卵管放入盛有卵子处理液 (HEPES) 含 5% 胎牛血清 (fetal calf serum, FCS) 的培养皿中;在体视镜下用针刺破明显肿胀的输卵管壶腹部,将有液体流出,取出其中的卵丘卵母复合体 (cumulus-oocyte

complexes, COCs);将取出的 COCs 在受精液 (Fertilization, 10% FCS) 中清洗 2~3 次后放入盛有 Fertilization 液 (含 5% FCS) 的培养皿中置于 5% CO₂、37℃ 培养箱培养 1~2 h;将收集的 COCs 用 HEPES 液 (5% FCS) 中清洗 2~3 次后放入含有 0.1% 透明质酸酶的 HEPES 液中处理 1 min,然后用于卵母细胞直径相似的玻璃吸管反复吹吸去掉卵丘颗粒细胞,获得裸卵 (deruded oocytes, DOs);将洗净的 DOs 放入 Fertilization 液 (10% FCS),挑选出含有第一极体且形态正常的 M II 期卵母细胞置于 5% CO₂、37℃ 培养箱培养。

(4) 圆形精子细胞注射

将获取的卵母细胞放入 HEPES 微滴中,调整卵母细胞,使其第一极体位于 12 点或 6 点,持卵针于 9 点位置固定卵母细胞;显微折射针挑选圆形精子细胞并回吸 3 个刻度 (操作臂上刻度),于 3 点位置刺入卵母细胞中,然后开始回吸胞质,直至破膜后立刻停止回吸,然后将圆形精子细胞缓慢注入卵母细胞胞质中,抽出注射针,固定针释放卵母细胞;

(5) 胚胎观察

将圆形精子细胞注射后并激活的卵母细胞进行培养,ROSI 后 16~18 h (D1) 观察每个卵母细胞原核出现情况;ROSI 后 44~46 h (D2) 观察每个卵母细胞分裂并分级;68~70 h (D3) 观察卵裂并分级,随即立刻转入囊胚培养液 (含 5% FCS) 中培养,116~118 h (D5) 观察培养成囊情况及分级。

1.3 统计学方法

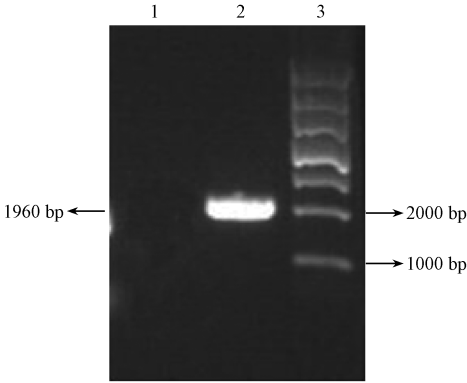
本研究项目数据均采用统计学软件 SPSS16.0 进行统计分析,计数资料采用率 [$n(\%)$] 表示,行方差分析,其 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 质粒 pCRII-TOPO- PLC ζ 的构建结果

以小鼠基因组为模板进行目的基因 PLC ζ 的扩增 (见图 2)。1% 琼脂糖凝胶电泳显示目的条带大小约为 1960 bp,与目的基因大小相符。

将重组质粒 pCRII-TOPO- PLC ζ 进行双酶切鉴定 (见图 3)。双酶切后 1% 琼脂糖凝胶电泳显示目的条带大小分别为 4000 bp 和 1960 bp,于原质粒 pCRII-TOPO 和目的基因大小相符。且经过测序,目的基因序列未发生突变。

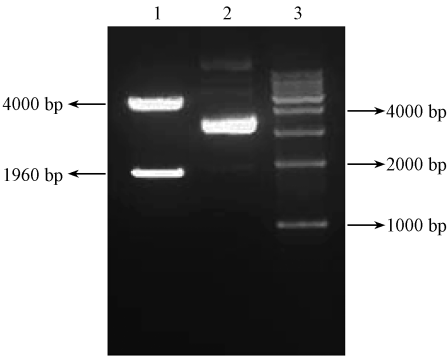


注: Lane1: 阴性对照; Lane2: PCR 扩增 PLC ζ 产物; Lane3: 1 Kbp DNA Ladder Marker。

图2 PCR 产物凝胶电泳分析

Note. Lane 1: negative control. Lane 2: PCR amplification of PLC ζ products. Lane 3: 1 Kbp DNA ladder markers.

Figure 2 Analysis of PCR product by gel electrophoresis



注: Lane1: 重组质粒 pCRII-TOPO- PLC ζ 双酶切样品; Lane2: 重组质粒 pCRII-TOPO- PLC ζ 样品; Lane3: 1 Kbp DNA Ladder Marker。

图3 重组质粒 pCRII-TOPO- PLC ζ 双酶切电泳图

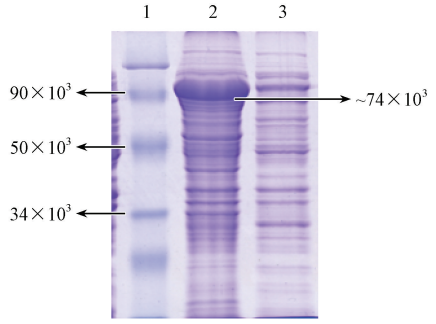
Note. Lane 1: recombinant plasmid pCRII-TOPO-PLC ζ double digestion sample. Lane 2: recombinant plasmid pCRII-TOPO-PLC ζ sample. Lane 3: 1 Kbp DNA ladder markers.

Figure 3 Recombinant plasmid pCRII-TOPO-PLC ζ double enzyme digestion electropherogram

2.2 重组 PLC ζ 蛋白体外表达与鉴定结果

重组 PLC ζ 蛋白经体外诱导表达后进行 SDS-PAGE(见图 4)。在 90 kDa 附近出现大量表达蛋白条带,与重组蛋白预计大小 74×10^3 Da 相比略大。但切下该目的条带后进行质谱鉴定,为小鼠 PLC ζ 蛋白。

对该重组 PLC ζ 蛋白用 Western blot 评价其抗原性(见图 5)。在 90×10^3 Da 以下出现了一条特异性条带,大小符合重组蛋白预计大小。

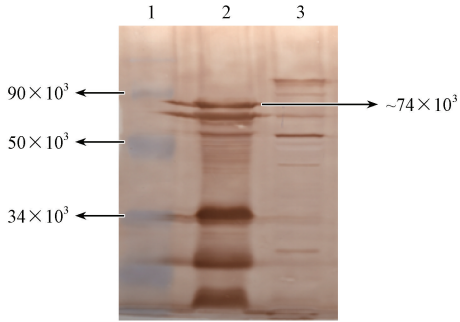


注: Lane1: 蛋白 Marker; Lane2: 重组质粒 pCRII-TOPO- PLC ζ 诱导样品; Lane3: 空质粒 pCRII-TOPO 诱导样品。

图4 体外诱导表达重组蛋白 SDS-PAGE 图

Note. Lane 1: protein markers. Lane 2: recombinant plasmid pCRII-TOPO-PLC ζ -induced sample. Lane 3: empty plasmid pCRII-TOPO-induced sample.

Figure 4 SDS-PAGE analysis of recombinant protein expression *in vitro*



注: Lane 1: 蛋白 Marker; Lane2: 重组质粒 pCRII-TOPO- PLC ζ 诱导样品; Lane 3: 空质粒 pCRII-TOPO 诱导样品。

图5 体外诱导表达重组蛋白 Western blot 图

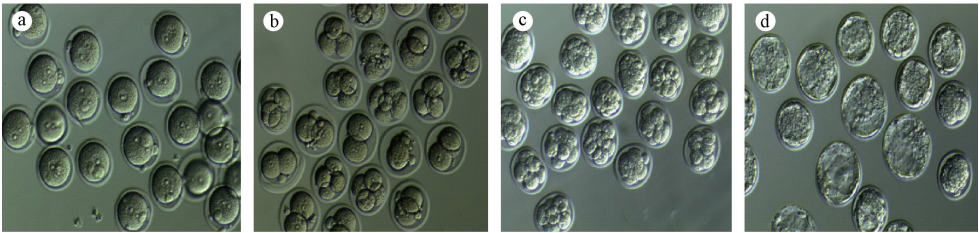
Note. Lane 1: protein markers. Lane 2: recombinant plasmid pCRII-TOPO-PLC ζ -induced sample. Lane 3: empty plasmid pCRII-TOPO-induced sample.

Figure 5 Western blot analysis of recombinant protein expression *in vitro*

2.3 小鼠 ROSI 后卵母细胞受精及胚胎发育结果

将小鼠圆形精子细胞与重组 PLC ζ 蛋白混合为实验组,另将小鼠圆形精子细胞与 HEPES 混合为空白组。分别进行 RSOI 后观察小鼠卵母细胞的受精情况和胚胎发育情况(见图 6)。

将两组小鼠卵母细胞的受精情况和胚胎发育情况统计其结果如下表 1 所示。实验组的受精率高于空白组,两者之间的差异无显著性($P > 0.05$)。但实验组的 2-4 细胞率、8 细胞率及成囊率均要略低于空白组,两者之间的差异无显著性($P > 0.05$)。



注:a;小鼠卵母细胞受精图;b;小鼠胚胎2-4细胞分裂图;c;小鼠胚胎8细胞及桑椹胚图;d;小鼠胚胎囊胚图。

图6 小鼠 ROSI 后卵母细胞受精及不同时期胚胎发育图

Note. a: mouse oocyte fertilization map after ROSI. b: mouse embryo two- to four-cell division graph. c: mouse embryo eight-cell stage and mulberry embryo graph. d: mouse embryo blastocyst graph.

Figure 6 The fertilization map of mouse oocytes after ROSI and the embryo development map in different period

表1 小鼠 ROSI 后卵母细胞受精及胚胎发育结果 (n = 150)

Table 1 Results of oocyte fertilization and embryo development after mouse ROSI (n = 150)

组别 Groups	受精率% (受精数/卵母细胞数) Fertilization rate% (No. Fertilization/ No. M II)	2-4 细胞率% (2-4 细胞数/受精数) 2-4 cell rate% (No. 2-4 cell/ No. Fertilization)	8 细胞率% (8 细胞数/受精数) 8 cell rate% (No. 8 cell/ No. Fertilization)	成囊率% (囊胚数/受精数) Blastocyst formation rate% (No. blastocyst/ No. Fertilization)
空白组 Blank group	39.33(59/150)	69.49(41/59)	67.80(40/59)	40.68(24/59)
实验组 Test group	42.00(63/150)	68.25(43/63)	63.49(40/63)	34.92(22/63)
χ^2/P 值 χ^2/P value	0.221/0.638	0.022/0.883	0.250/0.617	0.619/0.432

3 结论

PLCζ 是存在于脊椎动物精子中的一种特异性磷脂酶 C,属于磷脂酶 C 家族的一员,为可溶性的单链结构,通过 PLCζ 介导磷脂酰肌醇信号通路^[8]。PLCζ 催化活性部分是高度保守的 X 区和 Y 区,该区酶蛋白经折叠靠近后形成催化活性中心,具有 PLC 的典型结构。XY 结构区域分别含有 170 个氨基酸残基和 260 个氨基酸残基,若其中一个氨基酸残基发生突变,PLCζ 则会失去生物活性导致引发钙振荡的能力丧失^[9-10]。Kashir 等^[11]利用人类细胞系表达重组人类 PLCζ 蛋白,将该蛋白注入小鼠卵子中,能够产生与正常受精相同的 Ca²⁺ 振荡模式。再者 Saunders 等^[8]将小鼠 PLCζ mRNA 注射入成熟卵子中也可引发与受精时相似的 Ca²⁺ 振荡,而去除了 PLCζ 则不能引发卵母细胞 Ca²⁺ 振荡。Jones 等^[12]证实了精子中 PLCζ 活性要比其他组织高出 2 倍以上,单条精子的含量就可以引起 Ca²⁺ 振荡。虽然目前研究已证实 PLCζ 可以引发卵母细胞发生 Ca²⁺ 振荡,但 PLCζ 可否作为一种 ROSI 后卵母细胞的激活剂以及激活后对胚胎受精发育是否有影响,迄今为止研究甚少。因此,本研究将采用 PLCζ 作

为 ROSI 后卵母细胞激活的激活剂,探讨 PLCζ 作为激活剂的可行性及对 ROSI 后卵母细胞受精及胚胎发育的影响。

本研究中成功构建了真核表达载体 pCRR1-TOPO-PLCζ,并在体外表达了重组 PLCζ 蛋白,且具有良好的抗原特性。但是将重组 PLCζ 蛋白作为小鼠 ROSI 后的卵母细胞激活剂,卵母细胞受精率略高于空白组,但不具有显著差异。PLCζ 是影响男性生殖与不育的关键因素,也是一种重要的激活卵母细胞的精子因子。研究发现不能引发 Ca²⁺ 振荡的都是因为精子的 PLCζ 出现异常^[13]。但 Swann 等^[14]研究表明没有功能的 PLCζ 不会影响精子的发生及精子质量参数,如精子活力、活动率和顶体反应能力。由于本研究没有对重组的 PLCζ 进行功能评价,可能是本研究中卵母细胞受精率没有发生显著变化这一阴性结果的原因之一,因此 PLCζ 对卵母细胞受精及胚胎发育无影响还需进一步实验验证。另外研究结果还显示 2-4 细胞率、8 细胞率及成囊率却略低于空白组,却不具有显著差异,分析其原因可能是提纯的重组蛋白中含有其他种类的蛋白,会对胚胎的生长发育产生某些轻微影响,但目前尚无文献报道。

目前关于 Ca^{2+} 振荡对于卵子最佳激活和随后胚胎发育的重要性已有相当的争论。改变 Ca^{2+} 的数量和瞬变的频率可以微妙的影响胚胎基因的表达与发展潜力^[15],但也有研究结果显示未检测到任何形式的 Ca^{2+} 会影响缺失 PLC ζ 精子的 ICSI 结果^[16]。正如 Hachem 等^[17]学者所述,现今由于精子不能诱导活化卵子造成的男性不育现象可以通过人为的干预(如机械法、电子法或化学刺激法)来刺激诱导卵子活化的方法来处理此类男性不育。但是这些处理诱导的 Ca^{2+} 都是非生理性的,对人类发育的长期影响仍未明确,是值得广大医学工作者重点关注的问题。综上所述本研究中重组 PLC ζ 蛋白对卵母细胞受精及胚胎发育无显著影响,作为小鼠 ROSI 后的卵母细胞激活剂的可行性值得商榷。

参 考 文 献(References)

- [1] Palermo G, Joris H, Devroey P, et al. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte [J]. Lancet, 1992, 340(8810): 17–18.
- [2] Devroey P, Liu J, Nagy Z, et al. Pregnancies after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in non-obstructive azoospermia[J]. Hum Reprod, 1995, 10(6): 1457–1460.
- [3] Ogura A, Matsuda J, Yanagimachi R. Birth of normal young after electrofusion of mature oocytes with rounds permatid [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 9(116): 7460–7462.
- [4] Tesarik J, Mendoza C, Testart J. Viable embryos from injection of round spermatids into oocytes[J]. N Engl J Med, 1995, 333(8): 525.
- [5] Satouh Y, Nozawa K, Ikawa M. Sperm postacrosomal WW domain-binding protein is not required for mouse egg activation1 [J]. Biol Reprod, 2015, 93(4): 94.
- [6] Urman B, Alatas C, Aksoy S, et al. Transfer at the blastocyst stage of embryos derived from testicular round spermatid injection [J]. Hum Reprod, 2002, 17(3): 741–743.
- [7] Tanaka A, Nagayoshi M, Takemoto Y, et al. Fourteen babies born after round spermatid injection into human oocytes[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(47): 14629–14634.
- [8] Saunders CM, Larman MG, Parrington J, et al. PLC ζ : a sperm-specific trigger of Ca^{2+} oscillations in eggs and embryo development[J]. Development, 2002, 129(15): 3533–3544.
- [9] Nomikos M, Elgmami K, Theodoridou M, et al. Phospholipase C ζ binding to PtdIns(4,5) P2 requires the X Y-linker region[J]. J Cell Sci, 2011, 124(15): 2582–2590.
- [10] Nomikos M, Elgmami K, Theodoridou M, et al. Male infertility-linked point mutation disrupts the Ca^{2+} oscillation-inducing and PIP2 hydrolysis activity of sperm PLC ζ [J]. Biochem J, 2011, 434(2): 211–217.
- [11] Kashir J, Jones C, Lee HC, et al. Loss of activity mutations in phospholipase C zeta(PLC ζ) abolishes calcium oscillatory ability of human recombinant protein in mouse oocytes [J]. Hum Reprod, 2011, 26(12): 3372–3387.
- [12] Jones KT, Matsuda M, Parrington J, et al. Different Ca^{2+} releasing abilities of sperm extracts compared with tissue extracts and phospholipase C isoforms in sea urchin egg homogenate and mouse eggs[J]. Biochem J, 2000, 346(3): 743–749.
- [13] Heytens E, Parrington J, Coward K, et al. Reduced amounts and abnormal forms of phospholipase C zeta (PLC ζ) in spermatozoa from infertile men [J]. Hum Reprod, 2009, 24(10): 2417–2428.
- [14] Swann K, Lai FA. The sperm phospholipase C – ζ and Ca^{2+} signalling at fertilization in mammals [J]. Biochem Soc Trans, 2016, 44(1): 267–272.
- [15] Ozil JP, Markoulaki S, Toth S, et al. Egg activation events are regulated by the duration of a sustained $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ signal in the mouse[J]. Dev Biol, 2005, 282(1): 39–54.
- [16] Sanusi R, Yu Y, Nomikos M, et al. Rescue of failed oocyte activation after ICSI in a mouse model of male factor infertility by recombinant phospholipase C ζ [J]. Mol Hum Reprod, 2015, 21(10): 783–791.
- [17] Hachem A, Godwin J, Ruas M, et al. PLC ζ is the physiological trigger of the Ca^{2+} oscillations that induce embryogenesis in mammals but conception can occur in its absence [J]. Development, 2017, 144(16): 2914–2924.

[收稿日期] 2018–05–24