

哺乳动物胚胎分割发展现状及展望

张 涌

(兽医系)

摘 要

本文系统综述了国内外哺乳动物胚胎分割的当前水平和今后发展趋势。对影响分割胚存活率的若干因素、分割胚的冷冻、人工嵌合体的制作、胚胎性别鉴定及卵核移植等方面的研究进展也作了简要介绍。

关键词：胚胎分割；哺乳动物；同卵双生；嵌合体；克隆胚；卵核移植；综述

胚胎分割是哺乳动物胚胎工程的重要组成部分。近年来，人们已将这项新技术应用于家畜繁殖领域内的研究，取得令人瞩目的成绩，展现出令人鼓舞的发展前景。

本世纪30年代，Pincus等首次证明2细胞兔胚的单个卵裂球在体内可发育为体积较小的胚泡。之后Tarkowski等人的实验胚胎学研究成果进一步证明了哺乳动物2细胞胚的每个卵裂球都具有发育为正常胎儿的“全能性”。

70年代以来，随着胚胎培养及移植技术的发展和提高，哺乳动物胚胎分割取得突破性进展。Mullen等(1970)通过二分2细胞胚卵裂球、体外培养及移植等程序，获得小鼠同卵双生后代。Willadsen(1979)，通过分离早期胚胎的卵裂球，成功地获得绵羊同卵双生后代。

1 80年代以来胚胎分割研究进展

80年代以来，哺乳动物胚胎分割的进展主要表现在：分割方法的研究及分割水平，影响分割胚活力因素和胚胎分割延伸技术研究等三个方面。

1.1 分割方法及分割水平

Willadsen在总结前人经验的基础上，对胚胎分割方法进行了系统的研究，创造出的一套独具特点的毛细管分离法。其主要步骤为：

- ①将固定管吸住胚胎，用玻璃针在透明带上作一切口，用一移植管把细胞从透明带中移出。
- ②用一支直径只能勉强通过细胞团的分离管吸取细胞团，使细胞间的联系变松，然后用一支只允许一个细胞通过的分离管将细胞分开。
- ③将分离完毕的细胞装入原透明带和备用透明带中。
- ④用双层琼脂包埋后移入中间受体。
- ⑤回收琼脂筒，去掉琼脂层，将细胞移入同期发情的受体^[1]。

本文于1986年6月15日收到。

Willadsen^[1]用该法对绵羊2, 4, 8细胞期的158个二分胚的发育能力进行了研究。从中间受体回收后, 有92%的半胚发育正常。将30个发育良好的半胚移植于受体后, 有24个发育成小羊羔。

1981年, 他进一步研究了绵羊4, 8细胞胚四分胚及8细胞胚八分胚的发育能力, 成功地获得同卵四羔和同卵三羔^[2]。同年, Willadsen et al.^[3]对8细胞牛胚四分胚的发育能力进行了研究。从中间受体回收后, 91%以上的四分胚以正常速度发育。他们将26个发育良好的四分胚移植于受体, 50天诊断, 有9个受体妊娠, 其中6头怀双犊。8个胎儿发育到足月出生, 其中三个来源于同一胚胎。

Willadsen法具有较高的同卵多生的优点, 但操作程序复杂, 又需琼脂包埋和中间受体寄养, 难以和胚胎移植同时配合进行。

Ozil^[4]对牛桑椹胚二分胚的发育能力进行了研究。在实验中, 他把分割后的14个半胚分别装入原透明带和备用透明带后, 立即将其移植于14头受体母牛。结果有9头受体妊娠, 其中6头怀双胎。Ozil分割法要求显微操作仪能同时控制5支显微玻璃器件, 这样就增加了分割胚胎时的操作难度。

1984—1987年胚胎分割部分研究结果

| 动物种类 | 分割阶段 | 分割程度(分) | 移植分割胚数(枚) | 受体数(只) | 受胎数/(率) (只)/(%) | 同卵双生(对) | 研究者 |
|------|---------------|---------|-----------|-----------|--------------------------------------|---------|---------------------|
| 马 | 2~8细胞 | 2 4 | 10 10 | | 10 ¹⁾ | 2 | Allen (1984) |
| 牛 | 晚期桑椹胚 早期囊胚 | 2 | 206 24 | 206 12 | 23 ¹⁾ 19 | | Brem (1984) |
| 牛 | 晚期桑椹胚 早期囊胚 | 2 | 96 | 58 | 60 | | Williams (1984) |
| 牛 | 致密桑椹胚 至囊胚 | 2 | 25 | 25 | 10 ¹⁾ | | Warfield (1986) |
| 绵羊 | 晚期桑椹胚 早期囊胚 | 2 | 34 | 17 | 9 ¹⁾ | 7 | Gatica (1984) |
| 山羊 | 2-8细胞 | 2 | 22 | 11 | 7 ¹⁾ | 2 | Tsunoda (1984) |
| 山羊 | 解化囊胚 | 2 | 22 | 11 | 6 ¹⁾ | 4 | Tsunoda (1985) |
| 山羊 | 扩张解化胚泡 | 2 | 8 | 4 | 3 ¹⁾ | 2 | 张涌 (1987) |
| 小鼠 | 桑椹胚 | 2 | 36 24 | 9 12 | 15 ²⁾ 10 ²⁾ | 5 3 | Nagashima (1937) |
| 小鼠 | 晚期桑椹胚 早期囊胚 | 2 | 20 28 | 5 7 | 3 ²⁾ 8 ²⁾ | 1 3 | 张涌 (1987) |

注: 1) 受体妊娠数; 2) 半胚发育为胎儿数

Gatica et al.^[5]进一步简化了分割方法。他先用固定管将胚胎固定好后, 用玻璃针在透明带上作一切口, 然而用移植管将细胞团移出, 并立即用一玻璃针将其一分为二, 最后用同一移植管将两枚半胚装入原透明带和备用透明带。他用该法分割34枚半胚移植于17只受体绵羊后, 有9只受体妊娠, 其中7只怀双胎。

Nagashima et al.^[6]先用链霉菌蛋白酶软化透明带后再用玻璃针分割小鼠胚胎, 也获得令人满意的结果。

Williams^[7]用显微手术刀对牛的晚桑椹胚和早期囊胚进行了分割。在实验中,他先用固定管将胚胎固定,再用显微手术刀在透明带上切一切口,并同时将卵细胞分成两部分。然后用移植管从袋状透明带中吸去一半细胞,将其置于空透明带中。分割后,将质量良好的28枚半胚移植于14头受体后,9头受体妊娠,其中6头受体怀双胞胎。1983年,他用同样的方法分割了72枚桑椹胚和早期囊胚,用非手术法将其移植于144头受体中,60天后检查,有72头受体妊娠。受体妊娠率为50%,但胚胎妊娠率达到100%^[8]。Williams分割方法简便,用固定管吸住胚胎后即可直接分割,从而大大简化了分割过程。

继Williams之后,许多学者用显微手术刀进行了分割胚胎的尝试。所用刀具也因研究者不同而异,有用刮脸刀片或眼科手术刀片磨制而成的显微手术刀,也有用盖玻片磨制而成的显微手术刀。实践证明,这些刀具都可用于分割哺乳动物胚胎。随着分割方法的完善和简化,近年来胚胎分割技术取得较决进展,成功的报道不断出现。这里仅就部分研究结果列表如下。这些结果基本上反映出胚胎分割的当前国际水平^[5, 9, 9-16]。

1.2 影响分割胚活力因素的研究

1.2.1 分割时胚胎的发育阶段: Williams^[11]将5.5~7.5天的牛胚分割后装入透明带。这些胚胎包括早桑椹胚、晚桑椹胚、早期囊胚和囊胚。其中的330枚半胚移植于同期发情多体后,60天检查,各阶段半胚的妊娠率分别为:早桑椹胚16%,晚桑椹胚48%,早期囊胚60%,囊胚54%。看来,早期囊胚对分割的耐多力较其它三个发育阶段的胚胎大。

1.2.2 胚胎的质量: Brem^[10]在实验中将分割前的胚胎按质量分为优、良、劣三等。分割移植后,每类半胚的受胎率分别为52.4%, 28.8%, 5.6%^[10]。

1.2.3 透明带: 对于家畜,桑椹胚之前各阶段胚胎没有透明带,则在体内不能发育或发育不良。这一点已确信无疑。但透明带对晚期桑椹胚和囊胚阶段的分割胚在体内发育的影响,目前尚有争议。过去不少研究表明,分割受精后7天的牛胚,装入透明带要比不装入透明带的移植效果更好些。但Voelkel^[17]、Warfield^[12]的研究结果表明,分割牛的晚期桑椹胚和囊胚,装与不装透明带对其半胚的体内存活率并无明显影响。说明该时期牛胚二分胚在受体子宫内发育,其透明带并不是必不可少的。

1.2.4 分割程度: Willadsen^[2]证明,绵羊和牛4, 8细胞胚的四分胚具有发育为完整胎儿的能力。8细胞胚的八分胚在中间受体寄养中虽能形成囊状结构,但无明显的内细胞团形成^[2, 3]。Tsunoda^[13]把已在中间受体体内发育到桑椹胚和囊胚的14枚山羊四分胚移植于受体后,有2只母羊受胎^[13]。但四分胚的活力远比二分胚低。

2.2.5 半胚的移植数: Lambeth^[16]对移植半胚数和移植后受体受胎率的关系作了研究。他将一个半胚和两个半胚分别移植于同等条件的受体后,其妊娠率分别为16%和32%。在相似的实验中,ozil^[19]将一个半胚和两个半胚分别移植于受体家畜后,其受胎率分别为36%和72%。上述结果表明,受体受胎率随半胚移植数目的增加而增加。看来,半胚和子宫之间的通讯联系受移植半胚数目的影响,只有一定数目的半胚才能确保受体子宫能收到足以启动妊娠的讯号,否则受体的受胎率就会受到影响。

2.3 胚胎分割的延伸

胚胎分割和低温冷冻相结合是胚胎生物工程新的发展趋势之一。近期,分割胚冷冻及冻

胚分割都已取得成功。Willadsen^[1]将分割后的12枚绵羊半胚低温保存1~2月后解冻,选择其中9枚半胚移植,结果获得3只羔羊,其中2只有同卵双羔。Lehn-Jenson^[20]将牛桑椹胚分割装带后,用琼脂包埋,经过中间受体寄养后,选择发育至致密桑椹胚后的半胚进行低温冷冻。解冻移植后,有60%的半胚受胎。

Williams^[8]将胚胎分割和半胚染色体组型分析结合使用,进行了胚胎性别鉴定。其方法是将分割后的一枚半胚培养,用另枚半胚作染色体组型分析。待半胚性别确定后,根据其性别和生产需要决定是否移植。在这样的实验中,半胚的受胎率为50%。分割后,将不同胚胎的若干半胚融合在一起,或将一个胚胎的若干细胞注入另一胚胎的囊腔,人工制造嵌合体动物,近期已有不少成功的事例。Brem等^[21]将两种不同品种的牛胚分割后,把不同胚胎的半胚装入一个透明带内让其融合。通过这种方法已成功获得一头嵌合体牛犊。Fehilly et al.^[22,28]用相似的方法得到36只嵌合体绵羊和一只绵-山羊嵌合体羔。Summers^[24]采用囊胚注入技术,成功地制造出一头黄-瘤牛嵌合体犊。

3 远景展望

目前,胚胎分割虽属实验阶段,但成功的报道不断增多。今后的问题是通过完善操作程序、提高显微工具的分割能力,不断扩大硕果,力求有更多的同卵四生出现。分割冻胚和冻胚分割已获成功,但需深入研究,进一步提高冷冻半胚的受胎率。采用半胚染色体组型分析鉴定胚胎性别有较高的准确率,但目前还有许多问题有待解决。用Hy抗体鉴定胚胎性别,然后将雌性胚胎进行分割,这是目前值得认真研究的课题。如能有所突破,那么确定性别后的两个中意的半胚就可以弥补由于淘汰不中意性别的胚胎所造成的胚胎数目减少。

半胚冷冻和胚胎性别鉴定技术稳定后,将可以建立已知性别的半胚冷冻库,那时饲养者可按照自己的意愿去冷冻库中选种,带回自己所需的那个性别的两枚良种半胚去移植。

近几年,通过分割—融合的方式已获得不少嵌合体动物。今后这方面的研究将主要集中在创造更多具有高度杂种优势的新种家畜,特别是创造某些种间不育的嵌合体动物上,以获得大量能为人类提供更多更好畜产品的家畜和稀奇的观赏动物。采用这种技术有望把肉牛肉质鲜嫩和奶牛产奶量多的生产性能同时集中于嵌合体犊牛上;把奶山羊产奶多和绵羊毛质好的特点集中于绵-山羊嵌合体上。

到目前为止,某些发达国家的部分实验室已获得二代小鼠克隆胚。但现在存在的问题是胚胎每被分割一次,胚细胞的胞质就显得异常不足。据报道,现在使克隆胚基本细胞成份均一性的实验正在取得进展。如能有所突破,人们就可在分割—培养—再分割的不断循环中,由一个胚胎获得大量克隆胚。

将胚胎分割和卵核移植结合使用是生产克隆胚的又一种方法。它可以完全解决由于多次分割所造成的克隆胚胞质不足的问题。这种方法是先将桑椹胚细胞团分成单细胞,取出细胞核,然后将这些具有优良性状的细胞核注入一般家畜的去核受精卵中。在该核的支配下,产生具有优良性状的胎儿。采用这种方法有望由一个良种桑椹胚产生多达几十个克隆胚或克隆仔畜。

本文承蒙钱菊汾教授审核,谨致谢意。

参 考 文 献

- 1 Willadsen S M. The viability of early cleavage stages containing half the normal number of blastomeres in sheep. *J Reprod Fert* 1980; 59: 357—362
- 2 Willadsen S M. The developmental capacity of blastomeres from 4—and 8—cell sheep embryos. *J Embryol Exp Morph* 1981; 65: 165—172
- 3 Willadsen S M, Polge C. Attempts to produce monozygotic quadruplets in cattle by blastomere separation. *Vet Rec* 1981; 108: 211—213
- 4 Ozil J P, Heyman Y et al. Production of monozygotic twins by micromanipulation and cervical transfer in the cow. *Vet Rec* 1982; 110: 126—127
- 5 Gatica R, Boland M P. Micromanipulation of sheep morulae to produce monozygotic twins. *Theriogenology* 1984; 21: 555—561
- 6 Nagashima H, Matsui K et al. Production of monozygotic mouse twins from microsurgically bisected morulae. *J Reprod Fert* 1984; 70: 357—362
- 7 Williams T J, Elsdon R P et al. Identical twin bovine pregnancies derived from bisected embryos. *Theriogenology* 1982; 17: 114
- 8 Williams T M, Elsdon R P et al. Bisecting bovine embryos: methods, applications and success rates. *proc. Ann. Conf. Artificial Insemination and Embryo Transfer in Beef Cattle*, 1983; 45—51
- 9 Allen W R, Pashen R L. Production of monozygotic (identical) horse twins by embryo micromanipulation. *J Reprod Fert* 1984; 71: 607—613
- 10 Brem G, Kruff B et al. Identical simmental twins through microsurgery of embryos. *Theriogenology* 1984; 21: 225
- 11 Williams T J, Elsdon R P et al. Pregnancy rates with bisected bovine embryos. *Theriogenology* 1984; 22: 521—531
- 12 Warfield S J, Seidel G E et al. Transfer of bovine demi—embryos with and without zona pellucidae. *Theriogenology* 1986; 25: 212
- 13 Tsunoda Y, Yasui T et al. Production of monozygotic twins following transfer of separated half embryos in the goat *Japan J of zootechnical science* 1984; 55: 643—647
- 14 Tsunoda Y, Tokunaga T et al. Production of monozygotic twins following the transfer of bisected embryos in the goats. *Theriogenology* 1985; 24: 337—343
- 15 张涌, 钱菊汾, 王建辰等. 显微分割扩张孵化胚胎获同卵双生山羊羔. *西北农业大学学报* 1987; 15(2): 102—104
- 16 张涌, 钱菊汾, 王建辰. 小鼠胚胎分割方法及同卵双生试验. *西北农业大学学报* 1987; 15(2): 10—16
- 17 Voelkel S A, Humes P E et al. Pregnancy rates resulting from nonsurgical transfer of micromanipulated bovine embryos. *Proc 10th World Congress Anim Reprod* 1984; 2: 251—253
- 18 Lambeth V A, Looney C R et al. Microsurgery on bovine embryos at the morula stage to produce monozygotic twin calves. *Theriogenology* 1983; 20: 85—95
- 19 Ozil J P. Production of identical twins by bisection of blastocysts in the cow. *J Reprod Fert* 1983; 69: 463—468
- 20 Lehn—Jenson H, Willadsen S M. Deep freezing of cow “half” and “quarter” embryos. *Theriogenology* 1983; 19: 49—54
- 21 Brem G, Tenhumberg H et al. Chimerism in cattle through microsurgical aggregation of morulae. *Theriogenology* 1984; 22: 609—613
- 22 Fehilly C B, Willadsen S M et al. Experimental chimerism in sheep. *J Reprod Fert* 1984; 70: 347—351

- 23 Fehilly C B, Willadsen S M et al. Interspecific chimerism between sheep and goat. *Nature* 1984; 307: 634—636
- 24 Summer P M, Shelton J N et al. Synthesis of primary bos taurus -bos indicus chimeric calves. *Anim Reprod Sci* 1983; 6: 91—102

THE PRESENT SITUATION AND DEVELOPMENT TENDENCY IN FUTURE ON BISECTION (SEPARATION) OF MAMMALIAN EMBRYOS

Zhang Yong

(*Department of Veterinary Medicine*)

Abstract

The paper systematically reviewed the present levels and developing tendency in future on the technique for bisection (separation) of mammalian embryos at home and abroad. Also, it briefs on the progress of situation on factors affecting the survival of bisected embryos, freezing of bisected embryos, synthesis of chimerae, sex determination for embryos, and nuclear transplant in the mammal.

Key words: mammal; bisection of embryo; monozygotic twins; chimera; cloning embryo; nuclear transplant; review