

牛与小鼠胚胎在分化抑制培养系统中的行为比较^{*}

杨 奇, 安立龙, 窦忠英, 高志敏, 雷安民, 杨春荣

(西北农林科技大学 农业部家畜生殖内分泌与胚胎工程重点开放性实验室, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 在自制培养基中, 以原代小鼠胎儿成纤维细胞为饲养层, 观察比较了牛与小鼠胚胎在体外分化抑制培养体系中的生长行为。结果表明, 牛囊胚一般培养 36~60 h 后孵化脱带, 96~120 h 后贴壁, 120~144 h 为 ICM 传代的最佳时刻。小鼠囊胚一般培养 12~24 h 孵化脱带, 24~48 h 贴壁, 72~96 h 为传代的最佳时刻。牛胚胎贴附于饲养层上生长, 极易从饲养层上剥离; 小鼠胚胎镶嵌在饲养层中, 滋养层细胞与饲养层细胞间连接紧密。牛 ICM 色深发黑, 集落隆起程度较低; 小鼠 ICM 呈暗黄色, 有呈柱状增殖的趋势。牛滋养层呈网状, 小鼠滋养层为较致密的单层薄膜。

[关键词] 牛; 小鼠; 胚胎

[中图分类号] Q 813.7

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2001)02-033-05

胚胎干细胞(ES 细胞)是由早期胚胎或原始生殖细胞衍生出的一种多潜能细胞。其特点是在体外扩增、转化、筛选和冻存而不失其多能性, 可以被广泛应用于发育生物学的基础理论研究和转基因动物的生产实践。因此, 自 Evens 和 Kaufman^[1]首次建立小鼠 ES 细胞以后, 即吸引了大批学者投身于牛、羊、猪、水貂、兔、恒河猴和人 ES 细胞的研究之中^[2~8]。然而, 目前除小鼠外, 其他动物仅获得了类 ES 细胞, 未见有参与生殖系统嵌合的报道。ES 细胞的分离与克隆有 2 个前提条件, 一是抑制多能细胞的分化, 这涉及到细胞分化机制及分化抑制物作用机理的研究; 二是促进多能细胞的有效增殖, 这涉及到各种动物胚胎的发育进程及其特殊的营养需求。本试验是在特定的分化抑制培养体系中, 对牛与小鼠胚胎的发育进程、细胞增殖及分化规律等行为特征进行观察比较, 为进一步确立牛 ES 细胞培养体系提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

6~8 周龄昆明白系小鼠, 购自中国人民解放军第四军医大学试验动物中心, 饲养观察 7 d 后, 选用健康小鼠。3~7 周岁健康黑白花牛, 由西北农林科技

大学奶牛胚胎移植站提供。

1.2 溶 液

①小鼠成纤维细胞培养液 DM EM + 体积分数 15% NBS + 0.1 mmol/L β 巯基乙醇 + 0.1 μ mol/L 亚硒酸钠; ②小鼠冲胚液 DM EM + 体积分数 10% NBS; ③牛冲胚液 PBS + 体积分数 1% NBS; ④胚胎培养液 DM EM + 体积分数 15% NBS + 0.1 mmol/L β 巯基乙醇 + 0.1 μ mol/L 亚硒酸钠 + 10 μ g/mL LIF + 10 μ g/L IGF-1; ⑤细胞消化液 质量分数 0.2% 胰蛋白酶 + 质量分数 0.04% EDTA; ⑥细胞有丝分裂抑制剂 10 μ g/mL 丝裂霉素-C。

1.3 胚胎采集

小鼠胚胎的采集 选取发情静止期(外阴部发白)的小鼠于 20:00 腹腔注射 PM SG (10 mmol/(L·min·只)), 48 h 后腹腔注射 hCG (10 mmol/(L·min·只)), 按 1:1 比例与公鼠合笼过夜, 第二天 8:00 检查外阴, 见栓后 3~5 d 子宫采胚。

牛胚采集 选健康经产奶牛, 自然发情或前列腺醇处理后, 于情期第 9~12 d 直检有周期黄体且子宫弹性良好者常规超排处理, 6~8 d 后非手术采集胚胎。

* [收稿日期] 2000-04-24

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(39670359), 国家攻关课题资助项目(96-C01-03)

[作者简介] 杨 奇(1967-), 男, 新疆伊犁人, 在读博士, 主要从事动物胚胎工程与毒理学研究。

1.4 小鼠胎儿成纤维细胞饲养层的制备

选取铺满皿底的原代(或一代)小鼠胎儿成纤维细胞,吸去培养液,加入 5 mL 丝裂霉素-C 液,CO₂ 培养箱培养 1.5~2 h(38 °C,体积分数 5% CO₂,饱和湿度);用无钙镁 PBS(5~10 mL/次)清洗 5 次;加入细胞消化液 5 mL,38 °C 消化 2~3 min,轻轻摇动,见部分细胞脱离皿底时,用吸管吹打离散成单细胞悬液;加 5 mL 细胞培养液,用注射器吹打均匀,终止消化;将细胞悬液移入 15 mL 离心管,低速离心(1 000 r/min,3 min);弃上清液,加 10 mL 细胞培养液,吹打离散后,二次离心;弃上清液,加 2 mL 细胞培养液,吹打制成细胞悬液,吸 200 μ L,镜下计数,调整细胞浓度为 $3 \times 10^5 \sim 3.5 \times 10^5$ mL⁻¹;在明胶处理过的 1 cm 四孔板中,每孔缓慢加入 0.6 mL 细胞悬液,静止 1~2 min 后,轻轻移入培养箱,用前换液。

1.5 胚胎培养

将预先制好的饲养层四孔板中的培养液吸去,换入等量胚胎培养液,根据所得胚胎情况,分组放入鼠胚(2 枚/孔)或牛胚(1 枚/孔),置 CO₂ 培养箱培养(38 °C,体积分数 5% CO₂,饱和湿度)。每隔 12 h

观察记录一次。每 48 h 换一次溶液。

2 结 果

2.1 牛与小鼠胚胎的发育进程

牛囊胚一般在体外培养 36~60 h 后孵化脱带。在此过程中,滋养层细胞迅速增殖,囊腔增大,透明带变薄,ICM 位于一侧,增殖不明显。随后,透明带上出现一裂孔,胚胎由孔中孵出。孵化胚体积一般为初培养囊胚的 1.5~2 倍,但 ICM 占胚胎的比值变小。孵化胚在溶液中漂浮 48~60 h 后贴壁。囊胚脱带以后,囊腔破裂,胚胎收缩成团块,培养 12 h 后,恢复成孵化胚状,但与孵化胚相比,胚胎体积略小,ICM 占的比例大,胚胎周围不整齐。脱带处理能使胚胎贴壁时间提前约 12 h,但胚胎贴壁和 ICM 增殖情况与全胚培养时期相同,缺点是脱带过程中容易出现破碎。桑椹胚在培养过程同样要经历囊胚、孵化胚阶段,其他过程均与囊胚相似。因此,培养时间要延长 12~24 h。桑椹胚脱带后并不直接贴壁,而是悬浮于培养液中,12~24 h 后出现逐渐增大的囊腔,胚胎体积增大 0.5~1 倍,以后经历与囊胚相似的贴壁和 ICM 增殖过程(表 1)。

表 1 牛胚胎体外培养的发育进程

Table 1 Development of Bovine Embryos in vitro

胚胎类型 Type of embryo	胚胎数/枚 Number of embryo	贴壁时间/h Time of attachment	贴壁率/% Ration of attachment	ICM 增殖 高峰期/h Fastigium of ICM	胚胎类型 Type of embryo	胚胎数/枚 Number of embryo	贴壁时间/h Time of attachment	贴壁率/% Ration of attachment	ICM 增殖 高峰期/h Fastigium of ICM
囊胚 Blastula	12	96~120	75.0	120~144	裸桑椹胚 Nude Morula	3	96~120	66.7	120~144
裸囊胚 Nude Blastula	4	84~108	75.0	108~132	M/F 囊胚 M/F Blastula	3	96~120	66.7	120~144
桑椹胚 Morula	15	108~132	66.7	132~156					

小鼠胚胎的发育过程与牛胚胎相似,但进程快(表 2)。小鼠囊胚一般培养 12~24 h 孵化脱带,24~48 h 贴壁。小鼠桑椹胚一般培养 12 h 发育为囊胚,24~36 h 孵化脱带,36~60 h 贴壁。由于小鼠胚胎发育进程快,贴壁率高(>80%),因此脱带处理对小鼠胚胎意义不大。但在试验中发现,培养的小鼠扩张

囊胚有少数不经历孵化过程,ICM 快速增殖并充满透明带,胚胎体积增大 2~3 倍,囊腔消失,整个胚胎就象一个巨型桑椹胚。这种胚胎贴壁后一般不推开饲养层,部分胚胎周围可见对饲养层的浸蚀痕迹。而且,贴壁后 ICM 的增殖不明显(见图 1)。

表 2 小鼠胚胎体外培养的发育进程表

Table 2 Development of Murine Embryos in vitro

胚胎类型 Type of Embryo	胚胎数/枚 Number of embryo	贴壁时间/h Time of attachment	贴壁率/% Ration of attachment	ICM 增殖高峰期/h Fastigium of ICM
囊胚 Blastula	56	24~48	87.5	72~84
桑椹胚 Morula	48	36~60	85.4	84~96

2.2 牛与小鼠胚胎的贴壁过程

牛胚胎贴壁过程有两种方式。一种是孵化胚 ICM 外层的滋养层细胞层先由一点附着固定于饲

养层上,随后贴壁细胞逐渐增多,附着面积渐增,囊腔破裂,囊腔液外流,胚胎塌陷,最后完全贴附于饲养层上,中央是隆起的 ICM,周围是两层重叠的滋

养层细胞(见图2)。另一种贴壁方式是孵化胚逐渐收缩成暗黑色的球形实体,在溶液中漂浮约12 h后,先由一点附着,最后完全贴附于饲养层上,约12 h后,以胚胎集落为中心,紧贴饲养层表面放射形延伸出网状的饲养层细胞(图3)。牛胚胎从开始附着到完全贴壁大约需要12 h。小鼠胚胎也是ICM外层的滋养层细胞层先由一点附着固定于饲养层上,随后贴壁细胞逐渐增多,胚胎附着面积增大,并最终完全贴壁。与牛胚胎不同的是,小鼠滋养层细胞好象分泌一种对饲养层细胞发生浸蚀和粘合作用的物质,胚胎贴壁过程更象是植入饲养层过程,所以胚胎完全贴壁后,整个胚胎即镶嵌于饲养层中,滋养层细胞直接贴在培养皿底并形成单层,ICM隆起并位于中央或一侧,ICM、滋养层和饲养层形成明显的立体反差(见图4)。

2.3 贴壁后牛与小鼠胚胎滋养层细胞的生长状况

牛胚胎在贴壁过程中,部分滋养层细胞先贴附于饲养层上,后贴壁的滋养层细胞逐渐覆盖在ICM和先贴壁的滋养层细胞上。在此过程中,先后贴壁的两层滋养层细胞间存在一个相互融合的过程,ICM也对覆盖于其表面的滋养层细胞发生类似于体内胚盘形成过程的作用。结果在胚胎完全贴壁之初,ICM表面有一层半透明的滋养层细胞薄膜,ICM周围是一层较厚的网状滋养层细胞,面积较小。继续培养,ICM周围的滋养层细胞迅速增殖,沿饲养层表面蔓延,呈无限扩展的趋势。牛胚胎滋养层细胞在自开始附着到贴壁后继续生长增殖的整个过程中,对饲养层细胞不造成可见的损伤,整个胚胎贴附于饲养层上生长,很容易从饲养层上剥离。而且挑取胚胎后,胚胎下面的饲养层细胞与周围的饲养层细胞在形态上完全相同。

小鼠胚胎则不同,滋养层细胞从一开始附着就对饲养层细胞发生浸蚀和粘合作用。小鼠胚胎完全贴壁后,ICM即裸露,ICM周围的单层滋养层细胞直接贴附于培养皿底,并沿皿底迅速向四周扩增,将饲养层细胞推开。小鼠滋养层细胞与其周围的饲养层细胞联系紧密,剥离时比较困难,一般情况下都是将滋养层撕裂,而不能破坏滋养层与饲养层间的连接。贴壁后,小鼠滋养层细胞虽然发生不同程度的增殖,但未呈现出无限增殖的趋势。而且继续培养,小鼠滋养层细胞变扁变大,形成典型的合胞体结构(图5)。从集落形态看,牛的滋养层较厚,网状结构明显,周边整齐且与饲养层界限清晰,而小鼠滋养层为较致密的单层薄膜,明显低于周围的饲养层。

2.4 贴壁后牛与小鼠胚胎ICM细胞的生长状况

胚胎贴壁过程伴随着ICM的迅速增殖。牛

ICM色深发黑,中央高,周边渐低,边缘不整齐(见图2)。牛胚胎贴壁后12~36 h ICM增殖至最高峰,此时ICM体积最大,为传代的最佳时机,以后周边细胞开始迁移分化,ICM体积逐渐变小乃至消失,这与滋养层呈现的无限增殖趋势形成强烈反差。在增殖过程中,牛ICM直径比高度的增大明显,因而集落隆起程度较低。牛胚胎贴壁后均能分离到ICM,但胚胎质量不同ICM的分离效果也不同。ICM集中的胚胎,贴壁后增殖的ICM呈团块状,细胞数量大,结构紧凑;ICM松散的胚胎,贴壁后增殖的ICM呈条状或网状,细胞数量相对较少,而且极易分化、消失。虽然牛囊胚和桑椹胚在贴壁率上无显著差异,但从所得ICM的增殖效果看,囊胚要优于桑椹胚。

小鼠ICM呈暗黄色,周边整齐,隆起明显,增殖速度快,由于高度隆起的ICM形成的强烈反差,整个胚胎似乎就是推开饲养层生长的盘状ICM。小鼠胚胎贴壁后24~48 h高至增殖高峰,在快速增殖时,集落高度比直径的增大明显,有呈柱状增殖的趋势。而且,在试验中也得到了一个柱状的ICM(见图6)。小鼠ICM一般在培养的第4天开始分化,分化从周边细胞开始逐渐向中央发展,表现为细胞体积增大,细胞间界限清晰。

3 讨论

胚胎培养是分离ES细胞的重要环节之一。其目的是在抑制其分化的前提下,使ICM细胞大量增殖,同时给细胞一个逐渐适应环境的过程。只有保证足量的ICM细胞,并使其在体外环境中获得较强的生存能力后,才能有效分离到ES细胞。但是,不同种动物的胚胎有其特殊的营养需求,而且在发育规律和对外界环境的敏感性等方面存在着差异。因此,就出现了体外培养系统中生长行为的差异。从试验结果看,在本试验培养系统中,小鼠胚胎的发育进程明显快于牛胚。这一方面说明本系统更适宜于小鼠胚胎的生长,同时也表现出牛与小鼠胚胎在生命力和适应性上的差异。即使同种动物的同期胚胎,在不同的培养系统中,胚胎的发育进程也不同。例如,Saito等^[2]以TCM-99为基础培养基,研究结果表明,牛ICM初次传代时间为8~9 d。而钱永胜等^[5]以MEM- α 为基础培养基,结果是牛ICM初次传代时间为8~10 d。本研究认为,牛ICM的初次传代时间为5~6 d,造成这种差异的主要原因是所用的培养基不同。本培养系统以DMEM为基础培养基,添加了LIF和IGF-1。LIF是饲养层抑制ICM和ES细胞分化的主要细胞因子,而且能够通过抑制细胞

程序性死亡而促进细胞的生存^[12]。在哺乳动物妊娠早期, LIF 有促进胚胎发育和启动胚泡附着的双重作用^[13]。IGF-1 可以增强胚胎细胞中 DNA 和蛋白质的合成, 促进细胞分裂, 对滋养层和 ICM 的增殖有促进作用^[10, 11], 从而加快胚胎的孵化和贴壁时间, 以及贴壁后 ICM 的增殖速度。从试验结果看, 脱透明带处理能使牛胚胎的贴壁时间明显提前, 这可能是因为去除透明带的隔离和保护作用, 使得胚胎细胞直接与培养基接触, 从而加快了细胞的代谢和增殖速度。

牛胚胎贴壁后, 附着于饲养层上生长, 而且在贴壁和贴壁后的整个培养过程中, 未对饲养层细胞造成任何可见的损伤, 滋养层细胞与饲养层细胞间无特殊的紧密连接, 很容易剥离。相反, 小鼠胚胎一附着在饲养层上, 即对饲养层发生浸蚀和粘连作用, 所以胚胎贴壁后, 整个胚胎就镶嵌在饲养层中, 滋养层细胞直接贴在培养皿底呈单层生长, 而且滋养层细胞与其周围的饲养层细胞连接紧密, 很难剥离。在体内附植过程中, 小鼠胚胎的滋养层细胞具有能分解子宫上皮的溶酶蛋白, 对子宫内膜发生浸溶作用, 胚泡侵蚀, 穿入并包埋在子宫内膜里^[14]; 而牛胚泡并不植入子宫内膜, 只是通过胚盘附着于子宫内膜上, 滋养层主要与体中胚层形成绒毛膜。从胎盘类型看, 牛为上皮结缔绒毛膜型, 母体胎盘的组织层次为内皮层、结缔组织、上皮和子宫腔, 胎儿胎盘的组织层次为滋养层、结缔组织和内皮, 母体胎盘的子宫上皮细胞与胎儿胎盘的结缔绒毛膜相连; 小鼠则为血绒毛膜胎盘, 胎儿绒毛(包括绒毛膜上皮、结缔组织和胎儿血管内皮)直接浸入母体血液的血池内, 没有母

体的其他组织。

牛滋养层细胞在胚胎完全贴壁时较少, 以后迅速增殖, 并呈无限扩展的趋势; 而小鼠滋养层细胞贴壁后增殖速度明显减慢, 与其 ICM 的快速增殖形成强烈的反差。产生这种差异的原因可能是牛滋养层细胞, 始终保持分裂增殖状态, 而小鼠滋养层细胞则因发生细胞融合而形成合胞体^[14]。也有人认为是由于小鼠滋养层细胞发育至囊胚期后, 滋养层细胞只进行 DNA 的合成和细胞核的分裂而不发生胞质分裂, 从而形成滋养层合胞体^[9]。

牛 ICM 由于富含糖颗粒而颜色发黑, 小鼠 ICM 则呈暗黄色。小鼠 ICM 在快速增殖时, 集落高度比直径增大更明显, 有呈柱状增殖的趋势。相比之下, 牛 ICM 集落的隆起程度较低, 而且周边不整齐。这可能是由于物种本身的遗传特征所决定的。从早期胚胎的形态看, 小鼠胚胎到了扩张囊胚期, ICM 明显集中并向囊腔内柱状凸起, 而牛胚在扩张囊胚期 ICM 则呈新月状, 隆起程度明显较差。

牛囊胚和桑椹胚在贴壁率上虽然没有显著差异, 但在 ICM 的增殖效果上囊胚要略优于桑椹胚。这可能是由于桑椹胚要经历形成囊胚的过程, 而体外培养系统终究不如体内环境。也可能是因为囊胚和桑椹胚对体外环境的适应能力存在差异而造成的。体外受精胚虽然在形态和细胞数量上不及鲜胚, 但占有对体外培养环境适应性强的优势, 因此在贴壁率和贴壁后 ICM 的增殖上与鲜胚较为一致。Ito-T 等^[4]比较了牛体内和体外培养的桑椹胚和囊胚分离 ES 细胞的效果, 只在囊胚组获得了 ES 样细胞, 克隆率分别为 16.0% 和 17.1%。

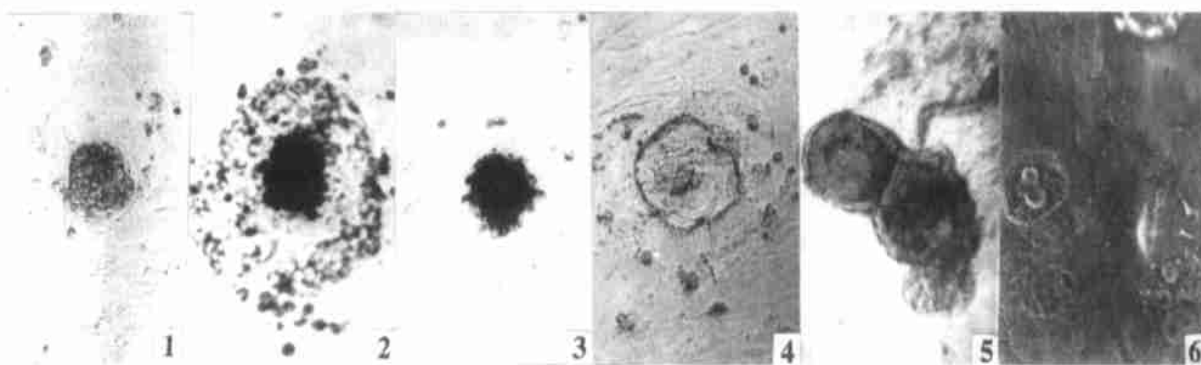


图 1~6 牛与小鼠胚胎在分化抑制培养系统中的行为比较

图 1 未脱透明带贴壁的小鼠胚胎。×100; 图 2 贴壁生长的牛胚胎。×100; 图 3 收缩后贴壁生长的牛胚胎。×100; 图 4 镶嵌于饲养层中的小鼠胚胎。×100; 图 5 纵向增殖的小鼠 ICM。×100; 图 6 小鼠滋养层细胞形成的合胞体。×250

Fig 1- 6 Comparison of the growth behavior between bovine and murine embryo in a differentiation inhibitory system
Fig 1 Murine Embryo with pellucid zone; Fig 2 Attachment and grow Bovine Embryo; Fig 3 Attachment and grow Bovine Embryo after constriction; Fig 4 Murine Embryo enmeshing in feeder; Fig 5 Murine inner cell mass growing in portrait; Fig 6 Syncytia produced by murine trophoblast

[参考文献]

- [1] Evans M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos[J]. *Nature*, 1981, 292(9): 154- 156
- [2] Saito S. Bovine embryonic stem cell-like culture over several passages[J]. *Dev Biol*, 1992, 20(3): 134- 141
- [3] Tillmann, Meinecke. Isolation of ES-like cell lines from ovine and caprine preimplantation embryos[J]. *J Anim Breed Genet*, 1996, 113: 413- 426
- [4] Ito-T. Influence of stage and derivation of bovine embryos on formation of embryonic stem (ES) like colonies[J]. *J Reprod Dev*, 1996, 42(5): 129- 133
- [5] 钱永胜, 竇忠英. 牛和猪胚胎干细胞的分离与克隆[J]. *四川大学学报(自然科学版)*, 1996(专辑): 142- 147
- [6] Sukoyan. Isolation and cultivation of blastocyst derived stem cell lines from American Mink (*Mustela vison*). *Mol Reprod Dev*, 1992, 33: 418- 421
- [7] Thomson J A. Isolation of a primate embryonic cell line[J]. *Dev Biol*, 1995, 92: 7844- 7848
- [8] Michael J. Shamblott, Joye A xelman. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells[J]. *Dev Biol*, 1998, 99: 13726- 13731
- [9] 赖良学. 家兔胚胎干细胞的分离培养[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 1995
- [10] Watson A J. Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation embryo[J]. *Mol Reprod Dev*, 1992, 31: 87- 95
- [11] Gandolfi F. Paracrine and environmental factors influencing embryonic development from zygote to blastocyst[J]. *Theriogenology*, 1994, 41: 95- 100
- [12] Maurizio Pesce. Stem cell factor and leukemia inhibitory factor promote primordial germ cell survival by suppressing programmed cell death (apoptosis) [J]. *Development*, 1993, 118: 1089- 1094
- [13] 张春丽, 段恩奎, 曾国庆. 白血病抑制因子及其在胚胎发育和胚泡着床中的生理功能[J]. *生理科学进展*, 1997, 28(3): 240- 242
- [14] 俞慧珠, 叶百宽. 小白鼠胚胎发生[J]. 北京: 科学出版社, 1985

Comparison of the growth behavior between bovine and murine embryo in a differentiation inhibitory system

YANG Qi, AN Li-long, DOU Zhong-yǐng, GAO Zhǐ-m ĩn, L E I An-m ĩn, YANG Chun-rong

(Key laboratory of Animal Reproductive Endocrinology and Embryo Biotechnology of Agricultural Ministry of China,
Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi, 712100, China)

Abstract: The growth behavior differences between bovine embryos and murine embryos were studied on PMEF feeder layer using DMEM + 15% NBS + 0.1 mmol/L β -mercaptoethanol + 0.1 μ mol/L Na_2SeO_3 + 10 μ g/mL LIF + 10 μ g/mL IGF-1 as the media. The results showed as follows: In the culture system, bovine blastocyst hatched after being cultured for 36- 60 h, and attached on the feeder layer after being cultured for 96- 120 h. After cultured for 120- 144 h, the growing ICM were passaged at first. Morulae attached on PMEF feeder layer 12- 24 h later than blastocyst for passing on blastula stage and hatching period. Murine blastocyst hatched after being cultured for 12- 24 h, and attached on the feeder layer after cultured for 24- 48 h. After cultured for 72- 96 h, the growing ICM were passaged. Bovine embryo lived on the feeder layer and easy to be stripped from the feeder layer, while murine embryo implanted in the feeder layer, and murine trophoblastic cells were closely connected with feeder layer cells surrounding them. The color of bovine ICM was more black than murine ICM. However, the colonies of bovine ICM were lower compared with murine ICM colonies, and murine ICM tended to be column-like. Bovine trophoblast was net-like, and murine trophoblast formed a membranous structure.

Key words: bovine; murine; embryo