

序贯共培养体系对小鼠早期胚胎 体外发育效果的影响

宋宇轩¹, 曹斌云¹, 李 胜², 王建刚¹, 程雪妮¹, 李 歆³, 辛亚平¹

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100;

2 陕西省畜牧兽医总站, 陕西 西安 710300;

3 西安职业技术学院, 陕西 西安 710077)

[摘 要] 将体外分离培养经超排处理的新西兰大白兔输卵管上皮及子宫内膜细胞接种于4孔板培养。处理1以CZB为培养液; 处理2以CZB加输卵管上皮细胞为培养体系; 处理3以CZB加子宫内膜细胞为培养体系; 处理4以CZB为培养液, 胚胎培养的前24 h在输卵管上皮细胞共培养体系中, 之后则转入子宫内膜细胞共培养体系中培养(处理4为序贯共培养体系)。将2-细胞期小鼠胚胎随机分配给4个处理, 统计各处理组小鼠胚胎的各期发育率及发育质量。结果表明, 序贯共培养体系胚胎的囊胚体外发育率显著高于其他共培养组($P < 0.05$); 囊胚孵化率及孵化囊胚的贴附率显著高于其他共培养组($P < 0.05$); 囊胚细胞总数各共培养组显著高于单独培养液组($P < 0.05$)。可见序贯共培养体系较单一细胞共培养体系能更好地模拟体内环境, 提高早期胚胎的发育率和发育质量。

[关键词] 序贯共培养; 小鼠胚胎; 输卵管上皮细胞; 子宫内膜细胞; 发育率; 发育质量

[中图分类号] S865.1⁺3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)11-0005-06

胚胎体外培养技术的研究为胚胎体外操作提供了可能。体外胚胎培养有力促进了育种学、发育生物学、生殖医学及胚胎工程学等学科的发展。近年来随着胚胎培养液的不断改进, 胚胎的体外发育率也得到了很大提高。但由于脱离母体环境, 胚胎的发育率及质量仍有很多问题, 如体外生产的胚胎染色体倍型异常率较高, rRNA基因的活性明显降低^[1], 许多蛋白因子基因的表达存在一定的差异^[2], 冷冻保存的效果较差^[3]。体外培养系统缺陷是导致胚胎吸收、死亡、流产、死胎或出生后死亡、以及胎儿过大综合症(Overgrowth Syndromes)的一个重要原因^[4-5]。采用与辅助细胞(Helper Cell)共培养的方式培养胚胎^[6-8], 建立更类似于体内环境的培养体系是解决这一问题的主要途径。哺乳动物早期胚胎的发育始于输卵管, 然后进入子宫, 最终在子宫发育为胎儿。以前的胚胎体外共培养研究, 仅限于某种细胞与胚胎一直共培养到囊胚, 这种体系虽然提高了胚胎体外发育率及发育质量, 但仍然不能很好地模拟体内发育环境。本研究将新西兰大白兔输卵管上皮细胞和

子宫内膜细胞与昆明白雌性小鼠早期胚胎进行序贯共培养, 即模拟胚胎在体内自然发育的过程, 先将胚胎与输卵管上皮细胞共培养一段时间后, 再与子宫内膜细胞共培养, 观察其对胚胎体外发育率及发育质量的影响, 以期对胚胎体外培养提供一种新方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试动物 4月龄2 kg左右新西兰大白兔和7~8周龄阴道口呈粉红的昆明白雌性小鼠均购自第四军医大学实验动物中心。

1.1.2 试剂 DMEM-F12培养液(Gibco公司); 磷酸盐缓冲溶液(PBS)和CZB培养液(自配); 胎牛血清(FBS)(北京元亨圣马生物技术研究); 孕马血清促性腺激素(PMSG)、人绒毛膜促性腺激素(hCG)、胰酶及液体石蜡油(Sigma公司)。

1.1.3 器材 培养瓶及4孔板(Nuck公司), CO₂培养箱(美国热电公司), 体视镜(厦门麦克奥迪公司)。

〔收稿日期〕 2005-12-29

〔基金项目〕 国家“863”计划项目(2002AA124051)

〔作者简介〕 宋宇轩(1971-), 男, 陕西凤翔人, 讲师, 在读博士, 主要从事动物生殖生理调控研究。

〔通讯作者〕 曹斌云(1957-), 男, 陕西周至人, 教授, 博士生导师, 主要从事动物生殖生理调控研究。

1.2 方法

1.2.1 兔子宫及输卵管的采集 采用4月龄2 kg左右新西兰大白兔为实验动物,手术前3 d下午16:00股部肌肉注射100 IU PM SG,手术前1 d下午16:00耳缘静脉注射75 IU hCG,手术当日早08:30耳缘静脉注射5 mL空气处死,消毒腹部,打开腹腔取双侧子宫及输卵管,置D'Hanks平衡液中。

1.2.2 输卵管上皮细胞的分离和培养 于超净工作台将1.2.1采取的输卵管首先用PBS溶液冲洗净残血,去除脂肪和结缔组织,用含100 U/mL青霉素和100 U/mL链霉素的DMEM-F12培养液冲洗,结扎输卵管一端,管腔内注入2.5 g/L胰蛋白酶溶液,然后结扎输卵管另一端,置于37℃、体积分数5% CO₂环境中培养20 min,打开输卵管用培养皿收集细胞悬液,用胰蛋白酶溶液再次冲洗输卵管腔,胎牛血清灭活胰蛋白酶后将细胞悬液移入无菌离心管中,1 000 r/min离心5 min,弃上清液,细胞沉淀用DMEM-F12制成悬液,接种于含体积分数10% FBS, 100 U/mL青霉素及100 U/mL链霉素的DMEM-F12培养液中,于25 cm²培养皿,37℃、体积分数5% CO₂以及饱和湿度条件下培养。待输卵管上皮细胞长至80%汇合或刚汇合时,即可接种于4孔板培养传代。

1.2.3 子宫内膜细胞分离和培养 将1.2.1采取的子宫用PBS洗净血渍后,在超净工作台上剪开,用手术刀轻刮子宫内膜,刮取物置于培养皿中,2.5 g/L胰酶消化5 min,少量FBS终止消化,如此重复消化若干次,消化液过筛网(筛孔直径0.128 mm)除去未消化组织,滤液转入10 mL离心管中,加入DMEM-F12培养液,1 000 r/min离心5 min,弃上清液,沉淀加培养液重悬后,接种于预先置有DMEM-F12培养液(含体积分数10% FBS, 100 U/mL青霉素及100 U/mL链霉素)的25 cm²培养皿中,于37℃、体积分数5% CO₂及饱和湿度条件下培养。待子宫内膜细胞长至80%汇合或刚汇合时,即可接种于4孔板进行传代培养。

1.2.4 小鼠2-细胞期胚胎的获得 选取7~8周龄阴道口呈粉红的昆明白雌性小鼠,下午16:00左右,每只小鼠腹腔注射PM SG 10 IU。47~48 h后,每只小鼠腹腔注射hCG 5 IU,并与正常公鼠合笼(公母比为1:2)。第2天上午09:00前观察母鼠有无阴道栓形成。第3天早上09:00断颈处死见阴道栓的小鼠,在体视镜下剥离输卵管后,于显微镜下用镊子撕开输卵管壶腹部,受精卵从输卵管流出,拣出2-细胞

期胚胎,随机分配给各试验组。

1.2.5 试验设计及观测指标 试验共设4个处理,将1.2.4所获胚胎随机分配给各处理组,于37℃、体积分数5% CO₂及饱和湿度条件下4孔板培养,每孔400 μL CZB培养液,石蜡油封顶。处理1以CZB为培养液(记为C);处理2以CZB加输卵管上皮细胞为培养体系(记为O);处理3以CZB加子宫内膜细胞为培养体系(记为E);处理4以CZB为培养液,胚胎培养的前24 h在输卵管上皮细胞共培养体系中,之后则转入子宫内膜细胞共培养体系中培养(此即为序贯共培养体系,记为O₂₄₊E)。统计各处理4-细胞期胚、8-细胞期胚、桑葚胚及囊胚的发育率。观察并记录每孔胚胎的囊胚孵化率、贴附率以及囊胚细胞数,所获数据用 χ^2 和多重比较方差分析进行统计分析。

1.2.6 囊胚细胞记数 将囊胚置于10 g/L柠檬酸钠中作用20 min,再移入5 g/L柠檬酸钠中10 min。取出囊胚置于载玻片上,加1~2滴甲醇-冰乙酸混合液(V(甲醇):V(冰乙酸)=3:1)固定15 min。加10 μg/mL Hoechst 33342染色30 min。封片,荧光显微镜下观察计数。

2 结果与分析

2.1 兔输卵管上皮细胞的体外培养及传代

在本试验中发现,兔的输卵管上皮细胞在培养2~3 d开始贴壁并形成细胞集落,3~6 d呈优势生长,6~9 d长满平皿底,细胞形状为不规则多角形,呈“铺路石”状(图1)。

2.2 兔子宫内膜细胞体外培养及传代

兔培养的子宫内膜细胞包括子宫内膜腺上皮细胞和基质细胞,腺上皮细胞贴壁后成长为致密单层细胞集落,细胞呈多角形,边界清楚,胞浆中有空泡,排列紧密时呈典型“铺路石”状;基质细胞则是具有成纤维细胞形态的梭形细胞,胞浆丰富,核椭圆,易传代,长期培养后细胞延伸成梭形,相互平行排列成束,密度大的区域聚集成涡旋状(图2)。

2.3 不同培养体系对小鼠早期胚胎体外发育率及发育质量的影响

从表1可以看出,C组的囊胚发育率显著低于输卵管上皮细胞共培养O组($P < 0.05$),极显著低于子宫内膜细胞共培养E组和序贯共培养O₂₄₊E组($P < 0.01$);序贯共培养O₂₄₊E组的囊胚发育率则显著高于输卵管上皮细胞共培养O组及子宫内膜细胞共培养E组($P < 0.05$)。

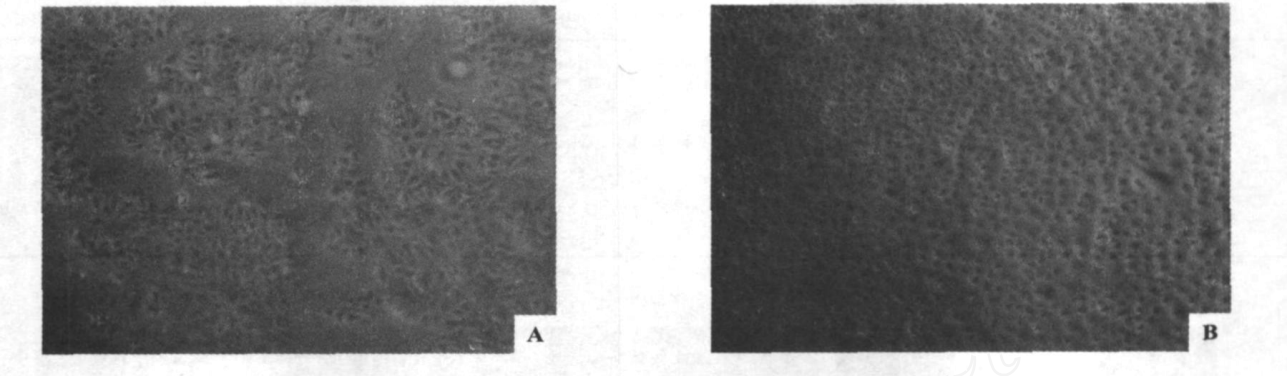


图1 兔输卵管上皮细胞的体外培养及传代(×50)

A. 原代;B. 1 代

Fig 1 Morphology of rabbit oviduct epithelial cell (×50)

A. Primary;B. Passage 1

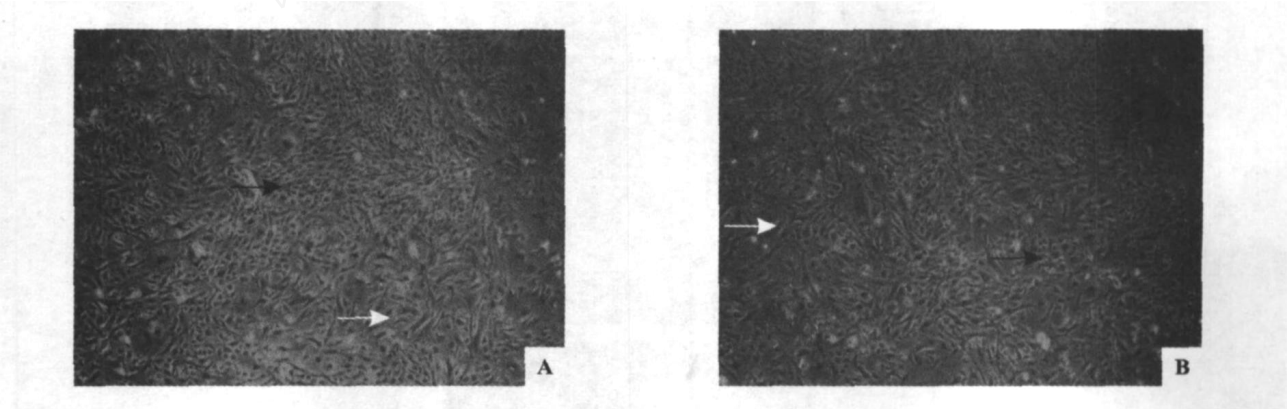


图2 兔子宫内膜细胞的体外培养及传代(×50)

A. 原代;B. 1 代; 黑箭头所示为上皮细胞; 白箭头所示为基质细胞

Fig 2 Morphology of rabbit endometrial cells

A. Primary;B. Passage 1; The black arrow indicates epithelial cells and the white arrow indicates stromal cells

表1 不同培养体系对小鼠早期胚胎体外发育率的影响

Table 1 Effect of different culture systems on the development rate of early murine embryos <i>in vitro</i>						%
处理 Group	胚胎总数 Total embryos	4-细胞期胚 4-cell stage	8-细胞期胚 8-cell stage	桑葚胚 Morula	囊胚 Blastula	
C	64	84 3% (54/64) a	65 6% (42/64) aA	53 1% (34/64) aA	46 9% (30/64) aA	
O	63	95 2% (60/63) b	88 9% (56/63) bB	69 8% (44/63) bA	63 5% (40/63) bAB	
E	67	83 6% (56/67) a	74 6% (50/67) cB	71 6% (48/67) bA	68 7% (46/67) bB	
O 24+ E	70	92 8% (65/70) b	90 0% (63/70) bB	87 1% (61/70) cC	82 9% (58/70) cB	

注: 同列数据后标不同小写字母者表示差异显著($P < 0.05$), 标不同大写字母者表示差异极显著($P < 0.01$), 下表同。

Note: The data in the same column with different lowercase means significant difference in 0.05 level, the data in the same column with different capital letters means significant difference in 0.01 level, the same as follows

从表2 可以看出, 各共培养组的小鼠囊胚孵化率均极显著高于单独培养液C 组($P < 0.01$), 子宫内膜细胞共培养E 组与序贯共培养O 24+ E 组的囊胚孵化率显著高于输卵管上皮细胞共培养O 组($P < 0.05$); 与子宫内膜共培养E 组相比, 序贯共培养O 24+ E 组有提高孵化率的趋势, 但差异不显著($P > 0.05$)。各共培养组的囊胚贴附率均极显著高

于单独培养液C 组($P < 0.01$), 序贯共培养O 24+ E 组的贴附率显著高于子宫内膜细胞共培养E 组与输卵管上皮细胞共培养O 组($P < 0.05$)。各共培养组之间囊胚细胞数差异不显著, 但均显著高于单独培养液C 组($P < 0.05$)。形态观察结果表明, 序贯共培养O 24+ E 组的胚胎发育正常(图3)。

表2 不同培养体系对小鼠早期胚胎体外发育质量的影响

Table 2 Effect of different culture systems on the development quality of early murine embryos *in vitro*

处理 Group	囊胚数 Number of blastula	囊胚孵化率/% Hatched rate of blastula	囊胚贴附率/% Attachment rate of blastula	囊胚细胞数 Number of the inner cells of blastula
C	30	33.3% (10/30) aA	20.0% (6/30) aA	46±10.8 a
O	40	55.0% (22/40) bB	45.0% (18/40) bB	57±9.9 b
E	46	63.0% (29/46) cB	45.7% (21/46) bB	55±10.1 b
O24+ E	58	70.7% (41/58) cB	63.8% (37/58) cB	59±11.3 b

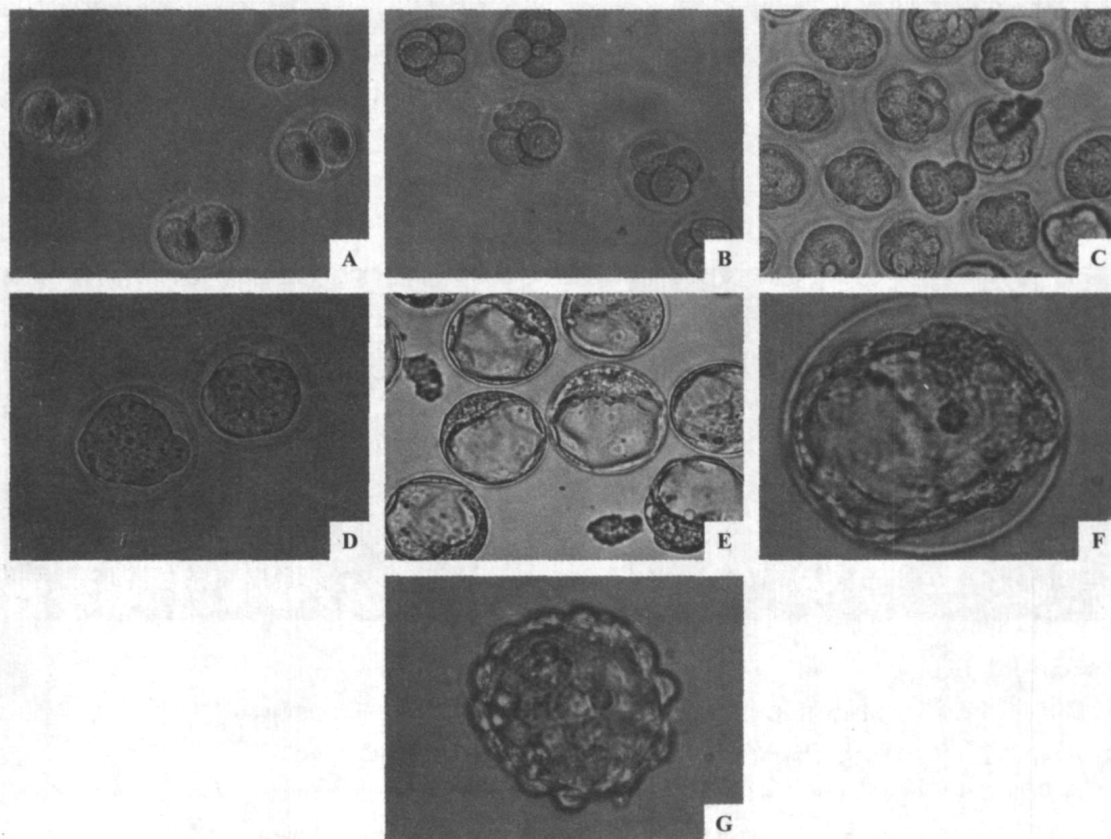


图3 序贯共培养组小鼠早期胚胎在体外发育的形态观察

A. 2-细胞期胚(×100); B. 4-细胞期胚(×100); C. 8-细胞期胚(×100); D. 桑葚胚(×100);

E. 囊胚(×100); F. 正在孵化的囊胚(×200); G. 孵化囊胚(×200)

Fig. 3 Morphology of the early embryos *in vitro* in the sequential co-culture system

A. 2-cell stage (×100); B. 4-cell stage (×100); C. 8-cell stage (×100); D. Morula (×100); E. Blastula (×100);

F. Hatching blastula (×200); G. Hatched blastula (×200)

3 讨论与结论

胚胎在体内发育过程中,与生殖道之间有着极为密切的双向交流,生殖道上皮细胞及一些基质细胞分泌的细胞因子对胚胎发育有很大的影响,因此有研究者采用体细胞与胚胎在体外建立共培养体系进行胚胎培养。所谓胚胎共同培养体系是指在培养基内加入一些辅助细胞(Helper Cell)与胚胎一起培养。胚胎共同培养的优点在于一方面是与胚胎共同培养的细胞能分泌一些物质,可去除胚胎培养过程中所分泌一些毒素^[9];另一方面是与胚胎共培养的

细胞也会分泌一些活性因子,促进胚胎发育到囊胚期。胚胎共培养体系常采用的细胞有输卵管上皮细胞、子宫内膜上皮细胞、卵丘细胞及非洲绿猴肾脏上皮细胞等。

作为胚胎发育的起始地,输卵管不仅为配子的运送、成熟、受精及早期胚胎发育提供合适的环境,而且其分泌的特异性蛋白——输卵管蛋白(Oviductin)对以上重要环节起促进作用^[10]。Rieger等^[11]发现,在4-细胞期至16-细胞期,糖代谢在输卵管上皮细胞共培养液中不活跃,却在桑葚胚期加快;在与输卵管上皮细胞共培养液中,葡萄糖浓度较低,

乳糖浓度较高。这说明输卵管上皮细胞不仅分泌胚胎发育所需要的营养物质,而且也在胚胎发育的不同阶段提供适当的微环境。Minami等^[12]研究认为,输卵管对小鼠胚胎发育的影响主要在2-细胞期胚形成后期至4-细胞胚期形成前期,这阶段鼠胚对输卵管因子的刺激最敏感,这些因子主要来源于输卵管壶腹部。以上研究结果表明,输卵管可以分泌活性因子刺激胚胎发育,但对前期胚胎的发育促进作用更为明显。

胚胎在输卵管发育很短时间后进入子宫,子宫是胚胎发育的最终场所。子宫内膜是子宫的主要功能层,因此亦有许多胚胎共培养体系以子宫内膜细胞为辅助细胞。子宫内膜可以分泌许多活性因子,如白血病抑制因子(LIF)、表皮生长因子(EGF)及许多细胞因子和黏附分子,这些物质均能有效提高胚胎的发育率和质量。Larry等^[7]利用人自体子宫内膜细胞(含基质细胞和上皮细胞)与人体外受精胚胎共培养,与其在传统培养液中培养相比,分裂球数显著增加,胞质碎片率明显下降。Carlos等^[8]用人自体子宫内膜上皮细胞做饲养层培养人胚胎的研究表明,培养至囊胚阶段的胚胎移植后安全,可显著提高着床率和怀孕率,且不存在伦理问题。以上研究表明,子宫内膜细胞共培养体系对胚胎发育质量具有显著地促进作用,依据自然生理状况,子宫内膜对早期小鼠胚胎体外发育率及发育质量的促进作用可能

在8-细胞期后更为明显。

小鼠2-细胞期胚胎在输卵管20~30 h后发育到桑葚胚进入子宫角,因此胚胎前期的发育主要在输卵管进行,而后期的发育主要在子宫进行。以前的共培养研究只是局限于用一种体细胞与胚胎一直培养到囊胚,这显然不能更好地模拟胚胎在体内的实际发育环境。

依据胚胎在体内发育的实际生理状况,本试验将小鼠2-细胞期胚胎在输卵管上皮细胞共培养体系中培养24 h后转移至子宫内膜细胞共培养体系中培养,目的是更好地模拟胚胎体内发育环境。本试验结果表明,序贯共培养体系对小鼠胚胎的囊胚体外发育率相比于其他共培养组具有显著的促进作用($P < 0.05$);囊胚孵化率及囊胚贴附率亦显著高于其他共培养组($P < 0.05$);囊胚细胞总数是反映胚胎质量的一个间接指标,本试验各共培养组之间囊胚细胞总数差异不显著($P > 0.05$),但各共培养组囊胚细胞总数显著高于单独培养液组($P < 0.05$),相对于单一共培养体系,序贯共培养体系有提高囊胚细胞总数的趋势($P > 0.05$)。

本研究结果表明,序贯共培养体系可以在体外为胚胎发育提供一种更类似于体内的环境,有利于体外胚胎囊胚发育率和发育质量的提高,为胚胎工程的发展及不育不孕症的治疗提供了一种新思路。

[参考文献]

- [1] Hyttel P, V iuff D, Laurincik J, et al Risks of *in-vitro* production of cattle and swine embryos: aberrations in chromosome numbers, ribosomal RNA gene activation and perinatal physiology[J]. Hum Reprod, 2000, 15(S5): 87-97.
- [2] Niemann H, W renzycki C. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by *in vitro* culture conditions: implications for subsequent development[J]. Theriogenology, 2000, 53(1): 21-34.
- [3] Enright B P, Lonergan P, Dinnyes A. Culture of *in vitro* produced bovine zygotes *in vitro* vs *in vivo* implications for early embryo development and quality[J]. Theriogenology, 2000, 54(5): 659-673.
- [4] Sinclair K D, Young L E, Wilmut I, et al In-utero overgrowth in ruminants following embryo culture: lessons from mice and a warning to men[J]. Hum Reprod, 2000, 15(S15): 68-86.
- [5] Lane M. Mechanisms for managing cellular and homeostatic stress *in vitro*[J]. Theriogenology, 2001, 55(1): 225-236.
- [6] Pegoraro L M, Thuard J M, Delalleau N, et al Comparison of sex ratio and cell number of IVF-IVF bovine blastocysts co-cultured with bovine oviduct epithelial cells or with Vero cells[J]. Theriogenology, 1998, 49(8): 1579-1590.
- [7] Larry I, Bamat M D, Hung-Ching L iu, et al Human preembryo development on autologous endometrial coculture versus conventional medium[J]. Fertility and Sterility, 1998, 70(6): 1109-1113.
- [8] Carlos S, Amparo M, Juan G V, et al Coculture of human embryos with autologous human endometrial epithelial cells in patients with implantation failure[J]. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1999, 84(8): 2638-2646.
- [9] Kane M T. The role of nutrients, peptide growth factors and co-culture cells in development of preimplantation embryos *in vitro*[J]. Theriogenology, 1992, 38(2): 297-313.
- [10] Xu K P, Yadav B P, Rorie R W, et al Development and viability of bovine embryos derived from oocytes matured and fertilized *in vitro* and co-cultured with bovine oviduct epithelial cells[J]. J Reprod Fertil, 1992, 94(1): 33-43.

- [11] Rieger D, Gisart B, Semple E, et al Comparison of the effects of oviductal cell co-culture and oviductal cell conditioned medium on the development and metabolic activity of cattle embryos[J]. J Reprod Fertil, 1995, 105 (1): 91-98
- [12] Minami N, Utsumi K, Iritani A. Effects of low molecular weight oviductal factors on the development of mouse one-cell embryos *in vitro* [J]. J Reprod Fertil, 1992, 96(2): 735-745

Effect of sequential co-culture system on the development and quality of marine embryos *in vitro*

SONG Yu-xuan¹, CAO Bin-yun¹, LI Sheng², WANG Jian-gang¹,
CHENG Xue-ni¹, LI Xin³, XIN Ya-ping¹

(1 College of Animal Sci-Tech, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 The General Station of Animal Husbandry and Veterinary of Shaanxi Province, Xi'an, Shaanxi 710300, China;

3 Xi'an Vocational Technical College, Xi'an, Shaanxi 710077, China)

Abstract: This study is to establish an effective co-culture system to improve the development rate and quality of early embryos *in vitro*. The oviduct epithelial cells and endometrial cells were isolated and cultured *in vitro*, then inoculated into 4-well plate. The 2-cell embryos of murine were cultured in single CZB media in treatment 1, co-cultured with oviduct epithelial cells in CZB in treatment 2, with endometrial cells in CZB in treatment 3 and with oviduct epithelial cells in CZB in the first 24 hours, and then transferred into the endometrial cells co-culture system to fulfill the culture *in vitro* in treatment 4. The results showed that more embryos in the sequential co-culture system reached the blastocyst stage than that in other co-culture system ($P < 0.05$); Sequential co-culture system could increase the hatching rate of the blastocysts and the attachment rate of hatched blastocysts compared to the other co-culture system ($P < 0.05$); All co-culture system could increase the cell number of the blastocyst compared with the single medium culture system ($P < 0.05$). This study demonstrates that the sequential co-culture system can better simulate the natural developing environment of embryos *in vitro* and improve the development rate and quality of early embryos.

Key words: sequential co-culture; mouse embryo; oviduct epithelial cell; endometrial cell; development rate; development quality