

猪输卵管上皮细胞对小鼠早期胚胎 体外发育的影响^{*}

赵永贞¹, 刘西梅², 李 莉², 乔宪凤², 魏 雁², 曹斌云¹, 魏庆信², 郑新民²

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100; 2 湖北省农科院 生物技术研究所, 湖北 武汉 430072)

[摘 要] 研究了不同生殖时期猪输卵管上皮细胞对小鼠早期胚胎体外发育的影响, 以此建立了适于早期小鼠转基因胚胎体外培养的猪输卵管上皮细胞共培养体系, 并用 PCR 法对体外培养发育到不同阶段的小鼠转基因胚胎进行了外源基因整合检测。结果表明, 在受孕初期的猪输卵管上皮细胞(无论是原代还是传代细胞)上, 培养的小鼠 1-细胞期胚胎的囊胚率显著高于发情间期的猪输卵管上皮细胞($P < 0.01$); 在相同生殖时期猪输卵管原代和传代上皮细胞上, 培养的小鼠 1-细胞期胚胎的囊胚率差异不显著; 在转基因胚胎不同发育阶段, PCR 检测呈阳性的胚胎比率分别为: 2-细胞期为 96%, 4-细胞期为 63%, 8-细胞期为 43%, 囊胚期为 19%。由此可见, 受孕初期的猪输卵管上皮细胞可促进与之体外共培养的小鼠早期胚胎的发育; 随着早期小鼠转基因胚胎的发育, PCR 检测呈阳性的转基因胚胎的比率逐渐降低。

[关键词] 显微注射; 共培养; 小鼠胚胎; 转基因

[中图分类号] Q813.1⁺1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)05-0009-05

Effect of swine oviduct epithelium cells on development of co-cultured mouse early embryos in vitro

ZHAO Yong-zhen¹, LIU Xi-mei², LI Li², QIAO Xian-feng², WEI Yan²,
CAO Bin-yun¹, WEI Qing-xin², ZHENG Xin-min²

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Biotechnology Institute of Hubei Academy of Agricultural Science, Wuhan, Hubei 430072, China)

Abstract: By comparing the effect of pig oviduct epithelium cells derived from different estrous cycle for culturing early transgenic mouse embryos, an effective co-culture system for culture of early embryos in vitro was built. The retention of foreign gene in mouse embryos was detected by PCR further. The results showed that there was no significant difference between the blastocyst rate of embryos co-cultured with pig oviductal epithelium cells (whether or not primary and passage cells) derived from pig oviduct during same estrous cycle. Blastocyst rate of embryos co-cultured with pig oviduct epithelium cells from pig oviduct during diestrus was significantly lower than metestrous. The rate of transgenic positive embryos in 2-cell, 4-cell, 8-cell and blastocyst stage was 96%, 63%, 43%, and 19%, respectively. All in all, pig oviductal epithelium cells derived from pig oviduct during metestrous can improve the development of mouse early embryos when mouse early embryos were co-cultured with it. With development of early embryos microinjected with foreign gene, the rate of transgenic positive embryos decreased gradually.

^{*} [收稿日期] 2006-04-10

[基金项目] 国家“863”计划项目(2001AA216071)

[作者简介] 赵永贞(1978-), 男, 甘肃张掖人, 在读博士, 主要从事家畜遗传育种与繁殖研究。

[通讯作者] 郑新民(1960-), 男, 湖北武汉人, 研究员, 主要从事家畜生物育种研究。

Keywords: microinjection; co-culture; embryos; transgenic

目前,显微注射法仍是转基因动物生产的主要方法,但该方法生产效率低,如何提高转基因效率,已经成为亟待解决的问题。用 PCR 法检测发育到不同阶段的胚胎中外源基因的滞留情况,以此为依据对早期转基因胚胎进行移植前筛选,是提高显微注射法转基因效率的有效手段,而建立早期胚胎培养体系是对显微注射转基因胚胎进行筛选的前提。早期胚胎体外培养的主要方法有简单化学限定培养液培养法和共培养法两种,与简单化学限定培养液培养法相比,共培养法更利于体外培养胚胎的发育。输卵管是早期胚胎发育的主要场所,输卵管上皮细胞共培养体系是一种比较理想的共培养模式。早在 40 多年前,Bigers 等^[1]就发现 2-细胞小鼠胚胎在离体培养的鼠输卵管内可以突破发育阻断继续发育。此后,研究者进一步证实,输卵管上皮细胞作为饲养层细胞在克服胚胎发育阻断^[2]、提高胚胎质量^[3]等方面均发挥着重要作用。在体外培养胚胎时,用于共培养的输卵管上皮细胞可来源于动物不同的生殖期。然而,有关动物不同生殖期输卵管上皮细胞对共培养胚胎体外发育的影响,目前还未见报道。为此,本研究探讨了不同生殖时期,猪输卵管上皮细胞对小鼠早期胚胎体外发育的影响,以此建立了适于早期小鼠转基因胚胎体外发育的猪输卵管上皮细胞共培养体系,并用 PCR 法对体外培养发育到不同阶段的转基因小鼠胚胎进行了外源基因检测,研究了外源基因在早期胚胎中的滞留规律,以为移植前转基因胚胎的培养及筛选提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物及猪输卵管 SPF 级昆明小白鼠购自湖北省疾病预防控制中心;猪输卵管采自湖北省农科院种猪场。

1.1.2 试剂及仪器 PMSG 为天津市华孚高新生物技术公司产品;hCG 为南京动物激素厂产品;透明质酸酶为上海第一生化药业公司产品;液体石蜡、青霉素、链霉素、35 mm 培养皿和 M₂ 培养基为 Sigma 公司产品;MB_{752/1} 培养基和胎牛血清为 Gibco 公司产品;无 Ca²⁺、Mg²⁺ Hanks 平衡盐溶液,胰蛋白酶粉剂为 Hyclone 产品;人血清白蛋白基因由湖北省农科院生物技术研究所分子遗传学实验室提供;拣卵针自制;CO₂ 培养箱为日本三洋产品;PXS1020

实体显微镜为上海光学仪器一厂生产;显微注射仪为德国 Eppendorf 公司产品。

1.1.3 引物 根据 Gene Bank 中发布的人 Albumin 的 cDNA 序列(登陆号:NM_000477),设计用于检测显微注射小鼠胚胎中人血清白蛋白基因的引物:

P1: 5'-CTT GTT GCT GCA AGT CAA GCT G-3';

P2: 5'-AGC CCA CAG AAA CTA GAA ATC CTC TAC CG3'。

引物由上海英俊生物技术有限公司合成。

1.2 小鼠 1-细胞期胚胎的采集

选择 5~6 周龄、体重 18~22 g 的健康雌性昆明小白鼠,腹腔注射 PMSG 10 U/只,46~48 h 后腹腔注射 hCG 10 U/只,与昆明雄鼠合笼过夜。次日早晨检查雌鼠是否有阴道栓,将有阴道栓小鼠于注射 hCG 24~26 h 后颈部脱臼处死,无菌分离输卵管,置于盛有 1 mL M₂ 培养基的培养皿中,在实体显微镜下撕开膨大部,待卵丘团完全流出后,立即用拣卵针移入含有 0.3 mg/mL 透明质酸酶的 M₂ 培养液中,处理 3~5 min,待颗粒细胞完全脱落后,选取形态较好的 1-细胞期胚胎,在 M₂ 培养液中洗 3~5 次,最后在待用培养液中洗 2~3 次,备用。

1.3 间情期猪输卵管上皮细胞的分离和原代培养

育肥青年母猪屠宰剖腹后,立即无菌采取输卵管,用灭菌生理盐水冲洗 2~3 次,保存于含有 200 U/mL 青霉素和 200 μg/mL 硫酸链霉素的 37 生理盐水中,于 2 h 内运回实验室。将取回的输卵管用灭菌生理盐水反复清洗几次后,平展于灭菌滤纸上,剪除输卵管系膜,拉直输卵管,取近子宫端 20 cm 的输卵管,并横断成 2 cm 小段,置于含有 EDTA 的 Hanks 液中。在 CO₂ 培养箱中孵化 2 h 后,纵向剖开,用眼科镊夹住小段一端用力在孵化液中抖动,上皮小块即可脱落,如脱落得效果不好,可再用灭菌载玻片轻轻在上皮表面刮动后再抖动,则可取得满意效果。将脱下的上皮细胞小块在预孵化的培养液中清洗多次后,视其数量的多少移入含体积分数 10%胎牛血清的 MB_{752/1} 培养基中,置体积分数 5% CO₂、38.5%、相对湿度 100%的 CO₂ 培养箱中培养 140 h(每隔 24 h 观察输卵管上皮细胞生长情况,每 48 h 换液 1 次)。

1.4 受孕初期(卵子受精~4-细胞期)猪输卵管上皮细胞的分离和原代培养

采用腹部切口手术法,将供体母猪的输卵管从腹腔拉出,输卵管冲胚后收集供体猪的输卵管冲卵液,2 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,再用培养液重新悬浮,如此洗涤 2~3 次。调整细胞浓度为 $1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$,移入含体积分数 10% 胎牛血清的 MB752/1 培养基中,置体积分数 5% CO_2 、38.5 °C、相对湿度 100% 的 CO_2 培养箱中培养 140 h(每隔 24 h 观察输卵管上皮细胞生长情况,每 48 h 换液 1 次)。

1.5 猪输卵管上皮细胞的传代培养

从培养瓶中去掉旧的培养液,用无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的 Hanks 液清洗 2~3 次。加入 1 mL 1 g/L 的胰蛋白酶,轻轻摇动培养瓶,使消化液流遍所有细胞表面。在 37 °C、体积分数 5% CO_2 、相对湿度 100% 的培养箱中培养 3~5 min 后观察,一旦发现细胞开始从瓶壁中脱落,立即加入含有血清的培养液终止胰蛋白酶的作用。吸出消化液,加入无血清培养液洗涤 2~3 次后,再加入适量的培养液,用吸管轻轻吹打贴壁细胞,调整细胞浓度为 $1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$,传代备用。

1.6 猪输卵管上皮细胞与小鼠胚胎的共培养

将间情期和受孕初期猪输卵管上皮细胞的原代和传代培养物移入 3.5 cm 培养皿,加入已平衡 2 h 的输卵管上皮细胞培养液 WM752/1,放入 37 °C、体积分数 5% 的 CO_2 培养箱中培养。待上皮细胞长满培养皿底后,更新一半培养液,并将小鼠 1-细胞期胚胎移入,于 37 °C、体积分数 5% CO_2 、相对湿度为 100% 的培养箱中培养 96 h(每隔 24 h 观察胚胎发育状况和输卵管上皮生长情况,每 48 h 换液 1 次)。

1.7 小鼠转基因胚胎的构建与培养

在凹玻片表面滴加 100 μL M_2 培养液,盖石蜡油后置于 Eppendorf 显微操作仪上,向其中移入 10~15 枚小鼠 1-细胞期胚胎。将持卵针和吸有人血清白蛋白基因的注射针调至合适的角度,把注射针针尖缓慢、准确地刺入雄原核,并注入 1.5 $\mu\text{g/mL}$ 的人血清白蛋白基因 1~2 pL,迅速退出注射针。待凹玻片上所有 1-细胞期胚胎注射完后,将其移入已建立的猪输卵管上皮细胞共培养体系中,置于 37 °C、体积分数 5% CO_2 、相对湿度 100% 的培养箱中培养,并分别收集发育到 2-细胞、4-细胞和 8-细胞及囊胚阶段的胚胎。

1.8 小鼠转基因胚胎中外源基因的 PCR 扩增

将不同发育阶段的单个小鼠转基因胚胎,在超

纯灭菌水中迅速洗 3~5 次,加到 10 μL 超纯水中,然后加入蛋白酶 K 至终浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$,于 37

保温 1 h,灭活蛋白酶 K(96 °C 持续 5 min)。通过以上方法处理的单个胚胎的基因组为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为:含有单个胚胎 DNA 的超纯水 10 μL ,10 $\times$ Buffer 2.5 μL ,2.5 mmol/L dNTP 2.5 μL ,10 $\mu\text{mol/L}$ 上、下游引物各 2.5 μL ,2 U/ μL Taq 聚合酶 1 μL ,加超纯水至 25 μL 。反应程序为:94 °C 2 min;94 °C 10 s,65 °C 30 s,68 °C 2 min,10 个循环;94 °C 10 s,65 °C 30 s,68 °C 2 min,25 个循环(每加 1 个循环各步反应时间增加 20 s);68 °C 6 min。同时设阳性和阴性对照,阳性对照以纯化的人血清白蛋白基因为模板,阴性对照组仅加基因稀释液。

1.9 数据分析

胚胎发育率的比较采用 χ^2 检验。

2 结果与分析

2.1 原代猪输卵管上皮细胞的生长特性

培养 24 h 时,在猪输卵管上皮细胞团块周边,可以明显地看到透明球状且有绒毛摆动的细胞,在培养液中似纤毛虫样游动;48 h 时,似纤毛虫样游动细胞增多,而且在每一上皮细胞块的周围,已有贴壁的上皮细胞蔓延生长,形状为多边形,细胞界限明显;72 h 后,在原上皮块周围新生的上皮细胞贴壁,形成多处生长点;弃去原代细胞块,继续培养 24 h 观察,多处生长点扩展相互连成一片,140 h 时,猪输卵管上皮细胞长满培养瓶底。

2.2 不同生殖期猪输卵管上皮细胞对小鼠胚胎发育的影响

不同生殖时期猪输卵管上皮细胞对小鼠胚胎发育的影响结果见表 1。由表 1 可知,在受孕初期原代和传代猪输卵管上皮细胞上培养的小鼠胚胎的囊胚率,显著高于发情间期的猪输卵管上皮细胞($P < 0.01$);在相同生殖时期猪输卵管原代和传代上皮细胞上,培养的小鼠 2-细胞期胚胎的囊胚率差异不显著($P > 0.05$)。

2.3 不同发育阶段小鼠转基因胚胎中人血清白蛋白基因的滞留情况

不同发育阶段小鼠转基因胚胎中人血清白蛋白基因的滞留检测结果见表 2。表 2 表明,随着转基因小鼠胚胎的发育,在检测胚胎中 PCR 鉴定为阳性胚胎的比率逐渐下降。

表 1 不同生殖期猪原代和传代输卵管上皮细胞对小鼠早期胚胎体外发育的影响

Table1 Effects of pig oviduct epithelium primerary or subculture cells coming from different time of pig estrous cycle on development of early embryos *in vitro*.

猪输卵管上皮细胞 Pig oviduct epithelium cells	小鼠胚胎总数 Number of 1-cell embryos	胚胎发育率/ % Stage of development		
		2 细胞期胚胎 2-cell embryos	4 细胞期胚胎 4-cell embryos	囊胚 Blastocyst
间情期原代细胞 Diestrous primerary cells	86	93 % a	71 % b	46 % c
受孕初期原代细胞 Metestrous primerary cells	90	92 % a	88 % a	74 % a
间情期传代细胞 Diestrous subculture cells	72	89 % a	68 % b	42 % c
受孕初期传代细胞 Metestrous subculture cells	85	90 % a	86 % a	76 % a

注 :a ,b 表示在 $P < 0.05$ 水平差异显著 ;a ,c 表示在 $P < 0.01$ 水平差异显著 ;b ,c 表示在 $P < 0.05$ 水平差异显著。
Note :The values with a , b differ significantly ($P < 0.05$) ; the values with a ,c differ very significantly ($P < 0.01$) ; the values with b ,c differ significantly($P < 0.05$)

表 2 不同发育时期体外培养的小鼠转基因胚胎中人血清白蛋白基因的滞留结果

Table 2 Retention of HSA gene in mouse embryos cultured *in vitro*

胚胎发育阶段 Stage of development rates	检测胚胎数 Number of embryos detected	阳性胚胎数 Number of positive	阳性率 % Embryos positive
2-细胞 2-cell	52	50	96
4-细胞 4-cell	60	38	63
8-细胞 8-cell	54	23	43
囊胚 Blastocyst	42	8	19

3 讨 论

发育阻断是哺乳动物早期胚胎体外培养中普遍存在的现象,这种现象在显微注射转基因胚胎上表现得更为严重。简单化学限定性培养液培养法,是早期胚胎培养中应用较为广泛的一种培养方法,但该培养方法的一个主要缺点是,发育到囊胚期的胚胎质量不高。共培养技术可以改善胚胎体外培养的条件、提高胚胎质量,故常用于显微注射转基因胚胎、核移植重构胚的体外培养。输卵管是早期胚胎发育的主要场所,其上皮细胞可以合成和分泌多种物质,这些物质的合成具有一定的阶段性,并不同程度地受体内多种激素的调控^[4]。输卵管上皮细胞在整个发情周期中都存在形态和生理活动的周期性变化,其中在临近排卵时,上皮细胞增高、分泌活动达到最高峰^[5]。体内发育的早期胚胎以输卵管上皮细胞分泌的物质为营养,获得了优于体外培养胚胎的发育效果。有研究表明,输卵管上皮细胞共培养体系是一种比较理想的共培养模式^[6-7]。然而,不同生殖期输卵管上皮对共培养胚胎体外发育的影响是否有差异,目前还未见相关的报道。输卵管上皮细胞对早期胚胎发育的作用没有种属专一性^[8]。因此,

本试验用猪输卵管上皮细胞作为共培养体系的饲养层细胞,研究了间情期和受孕初期猪输卵管上皮细胞对小鼠早期胚胎体外发育的影响。结果表明,用受孕初期猪输卵管上皮细胞(无论是原代还是传代细胞),培养的小鼠胚胎的囊胚率显著高于发情间期的猪输卵管上皮细胞($P < 0.01$);同一生殖时期猪输卵管上皮原代与传代细胞,共培养的小鼠胚胎的囊胚率差异不显著($P > 0.05$)。对以上结果可能的解释为,无论是受孕初期还是间情期,体外培养的输卵管上皮细胞均可分泌对早期胚胎发育有益的物质,但体外培养的受孕初期,输卵管上皮细胞提供的培养环境更接近于体内输卵管,因而能更好的支持体外培养的早期胚胎的发育。共培养细胞为早期胚胎发育提供的是一种动态的培养系统,不仅能根据胚胎不同发育阶段的生长需要提供营养物质,亦能通过自身营养代谢稳定培养液的理化性质,为胚胎正常发育提供适宜的微环境。本试验中,用受孕初期猪输卵管传代细胞作为饲养层,可使 76 %小鼠早期胚胎发育到囊胚期,建立了适用于早期显微注射转基因胚胎体外培养的共培养系统。

本试验对导入外源基因的胚胎进行体外培养,并对不同发育阶段的胚胎进行 PCR 检测,结果发现

越到胚胎发育后期,表现为“阳性”的胚胎数量越少。Page 等^[9]的研究结果显示,显微注射 2-细胞期和 4-细胞期小鼠胚胎外源基因滞留率分别为 88 %和 44 %,但他认为不严格控制实验条件,单纯 PCR 检测的结果并不可靠。由此可知,本试验 PCR 结果并不能完全排除假阳性胚胎,但从对大量胚胎检测结果的统计分析发现,越到胚胎发育后期表现为“阳性”的胚胎数量越少,这一结果与 Lu 等^[10]的研究结论相符。所以,对早期显微注射转基因胚胎进行移植前 PCR 筛选,就单个胚胎而言并不能完全确定其是否为转基因阳性,但对数目庞大的显微注射胚胎来讲,PCR 确实可以筛除大量阴性胚胎,这对提高转基因动物生产效率具有一定的作用。

[参考文献]

[1] Biggers J D, Gwatkin R B L, Brinster R L, et al. Development of mouse embryos in organ cultures of fallopian tubes on a chemically defined medium [J]. Nature, 1962, 194: 747-749.

[2] Eyestone W H, First N L. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviducal tissue or in conditioned medium [J]. J Reprod Fertil. , 1989, 85(2) : 715-20.

[3] Kidson A, Schoevers E, Langendijk P, et al. The effect of ovi-

duct epithelial cell co-culture during in vitro maturation on sow oocyte morphology, fertilization and embryo development [J]. Theriogenology, 2003, 59(9) : 1889-903.

[4] 马春杰, 朱伟杰. 输卵管特异性蛋白质的性质及其对配子和胚胎的影响[J]. 生殖与避孕, 2002, 22(2) : 123-125.

[5] Lane M, Gardner D K. Differential regulation of mouse embryo development and viability by amino acid[J]. J Reprod Fertil, 1997, 109(1) : 153-64.

[6] Reischl J, Prella K, Schol H, et al. Factors affecting proliferation and dedifferentiation of primary bovine oviduct epithelial cells in vitro[J]. Cell Tissue Res, 1999, 296(2) : 371-83.

[7] Tan X W, Ma S F, Yu J N, et al. Effects of species and cellular activity of oviductal epithelial cells on their dialogue with co-cultured mouse embryos [J]. Cell Tissue Res. 2007, 327(1) : 55-66.

[8] Shen H, Liu C J, Gu Z, et al. Rabbit oviductin“ DPf1-1” is tissue specific but not species specific [J]. Developmental and Reproductive Biology, 1996, 5(2) : 26-32.

[9] Page R L. Transgene detection during early murine embryonic development after pronuclear microinjection [J]. Trans Res, 1995, 4(1) : 12-17.

[10] Lu Y F, Tian C, Deng J X, et al. Studies on foreign gene integration during embryo early development [J]. Yi Chuan Xue Bao, 1998, 25(6) : 485-90.

(上接第 8 页)

王敏康等^[10]采用在 CCB 操作液中加 30 g/L 蔗糖的方法进行小鼠卵母细胞去核操作,并将重构的胚胎进行电融合、IVF 和胚胎移植,结果得到了正常的克隆小鼠,说明添加适宜质量浓度的蔗糖对重构胚的后期发育是安全的。因此,采用盲吸法进行山羊卵母细胞去核时,在合适 CCB 浓度的同时,加入质量浓度 25 g/L 的蔗糖,能够获得更好的去核效果。

[参考文献]

[1] Kono T, Kwon O Y, Nakahara T. Development of enucleated mouse oocytes reconstituted with embryonic nuclei[J]. J Reprod Fertil, 1991, 93: 165-170.

[2] McGrath J, Solter D. Nucleocytoplasmic interaction in the mouse embryo[J]. Embryo Exp Morphol, 1986, 97(suppl) : 277-289.

[3] Robl J M, Prather R, Barnes F, et al. Nuclear transplantation in bovine embryos[J]. J Anim Sci, 1987, 64: 624-647.

[4] Wang M K, Liu J L, Li G P, et al. Sucrose pretreatment for enucleation: an efficient and non-damage method for removing

the spindle of the mouse M II oocyte [J]. Mol Reprod Dev, 2001, 58(4) : 432-436.

[5] Saito N, Imai K, Tomizawa M. Effect of sugars-addition on the survival of vitrified bovine blastocysts produced in vitro [J]. Theriogenology, 1994, 41 : 1053-1060.

[6] Sanfins A, Lee G Y, Plancha C E, et al. Distinctions in meiotic spindle structure and assembly during in vitro and in vivo maturation of mouse oocytes [J]. Biol Reprod, 2003, 69 : 2059-2067.

[7] Longo J F. Gamete fusion and sperm incorporation [A] Longo J F. Fertilization. London: Chapman & Hall, 1997: 49-65.

[8] Levanduski M J, Westhusin M E. Effect of cytoskeletal inhibitor on fusion and development of bovine nuclear transfer embryos [J]. Theriogenology, 1990, 33 : 273.

[9] Smith I C, Wilmut I. Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development in vivo of sheep embryos after nuclear transplantation [J]. Biol Reprod, 1989, 40 : 1027-1035.

[10] 王敏康, 陈大元, 刘冀琰, 等. 小鼠卵母细胞 MII 期核(纺锤体)移植后经体外受精正常产仔 [J]. 生殖医学杂志, 2001, 10 : 141-147.