

牛体外受精卵与牛胎儿睾丸支持细胞体外共培养研究

刘 赛^{1,2}, 赵云程^{2,3}, 陈静波², 海丽且木², 赵晓娥¹, 马保华¹

(1 西北农林科技大学 动物医学院 农业部家畜生殖内分泌与胚胎工程重点开放实验室, 陕西 杨凌 712100;
2 新疆畜牧科学院, 新疆 乌鲁木齐 830000; 3 新疆农业大学 动物科技学院, 新疆 乌鲁木齐 830000)

[摘 要] **【目的】**研究牛胎儿睾丸支持细胞对牛早期胚胎的体外发育是否有促进作用。**【方法】**从屠宰场采集 5~7 月龄胎牛睾丸, 经原代和传代培养制备牛胎儿睾丸支持细胞(sertoli cells, SCs)饲养层, 对比原代和传代胎牛睾丸 SCs 与牛体外受精卵共培养时受精卵的发育情况; 分别以 4×10^4 , 2×10^4 mL⁻¹ 两个密度接种传代胎牛睾丸 SCs 与牛受精卵体外共培养, 并以培养液中无牛胎儿睾丸 SCs 饲养层为对照, 研究体外牛胎儿睾丸支持细胞(sertoli cells, SCs)对牛受精卵体外发育的影响。**【结果】**与牛受精卵体外共培养时, 接种密度为 2×10^4 mL⁻¹ 传代胎牛睾丸 SCs 饲养层共培养组的卵裂率(79.3%)高于原代牛胎儿睾丸 SCs 饲养层共培养组(69.2%), 但差异不显著($P>0.05$); 囊胚发育率(41.3%)极显著地高于原代 SCs 饲养层共培养组(16.7%)($P<0.01$)。接种密度为 4×10^4 mL⁻¹ 传代牛胎儿睾丸 SCs 饲养层共培养组的卵裂率大于接种密度为 2×10^4 mL⁻¹ 传代牛胎儿睾丸 SCs 饲养层共培养组和对照组, 但差异不显著; 胚胎发育率极显著地低于接种密度为 2×10^4 mL⁻¹ 传代牛胎儿睾丸 SCs 饲养层共培养组和对照组。**【结论】**制备的传代牛胎儿睾丸 SCs 饲养层, 能有效促进牛体外受精卵的体外发育, 提高囊胚发育率; 接种的传代牛胎儿睾丸 SCs 饲养层密度过大, 将严重影响牛体外受精卵的发育。

[关键词] 支持细胞; 共培养; 体外受精卵; 牛胎儿

[中图分类号] Q813.7; Q813.1⁺1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2008)02-0023-04

Study on bovine IVF zygote co-cultured with bovine fetal sertoli cells

LIU Sai^{1,2}, ZHAO Yun-cheng^{2,3}, CHEN Jing-bo²,
HAI Li-qie-mu², ZHAO Xiao-e¹, MA Bao-hua¹

(1 Key Laboratory of Animal Reproductive Endocrinology and Embryo Biotechnology, Ministry of Agriculture, College of Veterinary Medicine, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 Xinjiang Academy of Animal Science, Urumqi, Xinjiang 830000, China; 3 College of Animal Science and Technology, Xinjiang Agriculture University, Urumuqi, Xinjiang 830000, China)

Abstract: **【Objective】**In order to study the effect of bovine fetal SCs feeder layer on the development of bovine zygotes *in vitro*. **【Method】**5—7 months bovine fetal testis from slaughter house was collected, bovine fetal SCs feeder layer was made by primary culture and sub-culture, then co-cultured with bovine IVF zygotes and the developing results was of zygotes compared; sub-cultured SCs was inoculated in 2×10^4 mL⁻¹ and 4×10^4 mL⁻¹, to carry out co-culture with bovine *in vitro* fertilized (IVF) zygotes, and made control group with no fetal bovine SCs feeder layer in the media, to study the effect of bovine fetal SCs feeder layer at different phase on the development of bovine zygotes *in vitro*. **【Result】**The results showed that: when IVF zygotes co-cultured with sub-cultured bovine fetal SCs (sub-culture group) *in vitro*, the cleavage

* **[收稿日期]** 2007-02-16
[基金项目] 陕西省重大科技专项计划项目(2006KZ07-G1); 西北农林科技大学科研专项(04ZM001)
[作者简介] 刘 赛(1982—), 女, 河南漯河人, 在读硕士, 主要从事动物胚胎工程研究。E-mail: liusai19821225@126.com
[通讯作者] 马保华(1965—), 男, 陕西城固人, 副教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事动物胚胎生物技术研究。
E-mail: mabaohuaxn@tom.com

rate of zygotes (79.3%) was higher than those co-cultured with primary cultured SCs feeder layer (primary group) (69.2%), but there was no significant difference ($P>0.05$); the blastocyst development rate (41.3%) was significantly higher than primary passage group (16.7%) ($P<0.01$). Cleavage rate of zygotes co-cultured with SCs feeder layer which inoculated in $4\times 10^4\text{ mL}^{-1}$ was higher than that of in $2\times 10^4\text{ mL}^{-1}$, but there was no significant difference with that of in $2\times 10^4\text{ mL}^{-1}$, but as the lasting of the cultivation, the embryo development rate of zygotes co-cultured with SCs feeder layer which inoculated in $2\times 10^4\text{ mL}^{-1}$ was significantly different, lower than that in $2\times 10^4\text{ mL}^{-1}$ and control groups. 【Conclusions】 The fetal bovine SCs feeder layer made by sub-culturing cells can efficiently promote the *in vitro* development of bovine IVF zygotes, and increase the blastula developing rate; too high concentration of sub-culturing SCs feeder layer will effect the development of co-cultured bovine IVF zygotes obviously.

Key words: sertoli cells; co-culture; *in vitro* fertilized zygotes; fetal bovine

睾丸支持细胞(Sertoli cells, SCs)分泌的转铁蛋白^[1]、激活素(activin)^[2]、转移生长因子- α (Transforming Growth Factor- α , TGF- α)^[3-4]、 17β -雌二醇^[5](17β -estrol, 17β -E2)、类胰岛素生长因子(Insulin-like Growth Factor- I, IGF-1)^[5-8]等物质,在雌性动物体内与早期胚胎发育密切相关,提示睾丸SCs可能促进动物早期胚胎的体外发育。近年来的研究表明,睾丸SCs可分泌多种能够促进共培养细胞生长发育与功能保持的生物活性物质^[9]。体外培养睾丸SCs产生雄激素结合蛋白(Androgen Binding Protein, ABP)、转铁蛋白(Transferrin)、抑制素(Inhibin)及其他许多蛋白分子,这些物质对体外培养细胞有不同程度地促进增殖作用^[2]。将睾丸SCs作为饲养层与其他细胞如性原细胞、小鼠管状肌样细胞、胰岛 β 细胞等共培养,结果表明,SCs能够促进这些细胞的体外增殖^[10-12]。关于SCs能否促进动物早期胚胎的体外发育,目前尚未见研究报道。在胎儿和性未成熟的哺乳动物睾丸中,仅存在雄性生殖干细胞(Male Germ Stem Cells, mGSCs)和SCs^[13],选用胎儿睾丸作为SCs饲养层来源可能更有利于SCs的分离。本试验选择5~7月龄牛胎儿睾丸,分离牛胎儿睾丸SCs,并将其与牛体外受精卵共培养,确定合适的牛胎儿睾丸SCs的接种密度,建立基于牛胎儿睾丸SCs为饲养层的牛体外受精卵共培养体系,旨在研究牛胎儿睾丸SCs对牛体外受精卵体外发育的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂与仪器 新生牛血清(NBS)、DMEM(高糖)为HyClone公司产品;牛血清白蛋白(BSA)、肝素(Heparin)、丙酮酸钠、胶原酶Ⅳ(Colla-

genase)、胰蛋白酶(Trypsin)、EDTA- Na_2 、NAA(非必须氨基酸)、EAA(非必须氨基酸)均为美国Sigma公司产品。倒置相差显微镜由日本Olympus公司生产;体视显微镜由北京泰克公司生产。

1.1.2 操作液 卵母细胞成熟培养液为:M199培养液+体积分数10%牛卵泡液+0.055 g/L丙酮酸钠+0.075 g/L青霉素(Penicillin G)+0.050 g/L链霉素(Streptomycin)+体积分数10% NBS;精子获能液为:BO培养液+20 g/L BSA+20 $\mu\text{g/L}$ 肝素;受精液为:BO液+6 g/L BSA+20 $\mu\text{g/L}$ 肝素;胚胎培养液为:SOF培养液+体积分数1% NAA+体积分数2% EAA;牛胎儿睾丸SCs培养液为:DMEM(高糖)+体积分数10% NBS+0.075 g/L青霉素+0.050 g/L链霉素。

1.2 方法

1.2.1 牛卵母细胞的采集及其体外成熟培养 从屠宰场采集宰后30 min内母牛的卵巢,置于37℃生理盐水保温罐中2 h内带回实验室。用10 mL注射器(预先吸1~2 mL已平衡预热的加有血清的无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的磷酸盐缓冲液(D-PBS))抽吸卵巢表面2~8 mm卵泡中的卵泡液,约吸取5 mL左右卵泡液时,将注射器内的液体缓缓注入直径60 mm玻璃培养皿中,重复以上操作,直到抽吸完成,然后将抽吸出的卵泡液置于体视显微镜下拣出胞质均匀、有3~4层以上卵丘的卵丘-卵母细胞复合体(Cumulus-oocyte complexes, COCs)。将COCs在预平衡2 h以上的卵母细胞成熟培养液中洗涤3遍,移入含1 mL预平衡卵母细胞成熟培养液的直径35 mm玻璃培养皿中,置于38.5℃、体积分数5% CO_2 、饱和湿度条件下成熟培养24 h。轻轻吹打掉卵母细胞周围的部分卵丘,留1~2层卵丘,在预平衡2 h以上的受精液中洗涤3次后,移入1 mL受精

液中,备用。

1.2.2 牛精子的体外获能 在 CO₂ 培养箱中预平衡精子获能液 2 h 以上。取商品化牛细管冻精 1 支,于 37 ℃ 水浴解冻 15~20 s,吸取解冻后的精液小心置于含有 2 mL 精子获能液的离心管底部,15 min 后活精子上游,将上层液体吸出,置于 2.0 mL 离心管中,2 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,留精子和少量液体。用预平衡的精子获能液重新悬浮精子,使精子的密度为(2~5)×10⁶ mL⁻¹。

1.2.3 牛精子和成熟卵母细胞的共孵育(体外受精) 吸取 1 mL 已调整好密度的精子悬液,置于 24 孔培养板的 1 个培养孔中,将 25~35 枚成熟牛卵母细胞移入精子悬液中,置于 38.5 ℃、体积分数 5% CO₂、饱和湿度条件下培养 10 h。

1.2.4 牛胎儿睾丸 SCs 饲养层的制备 (1)原代牛胎儿睾丸 SCs 饲养层的制备。从屠宰场收集 5~7 月龄牛胎儿的睾丸(连同阴囊),置于 37 ℃ 生理盐水中 2 h 内带回实验室。剥离阴囊及鞘膜,将睾丸置于体积分数 75% 酒精中浸泡 2 min,用 D-PBS 充分冲洗 3 遍。在睾丸白膜上做 T 字形切口,取出睾丸实质组织,用添加青霉素和链霉素的 D-PBS 漂洗 3 次,洗去血污后置平皿中剪碎。加入 1 g/L 胶原酶 IV,室温下消化 15 min,其间振荡数次,500 r/min 离心 5 min,弃上清液,沉淀中加入 2.5 g/L 胰蛋白酶+0.2 g/L EDTA 继续消化,室温下消化 15 min,加入等体积含体积分数 10% NBS 的 DMEM(高糖)终止消化,用孔径 200 μm 尼龙滤网过滤,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清液,沉淀中加入 DMEM(高糖),调整细胞密度为 6.0×10⁴ mL⁻¹,接种于 24 孔培养板中,于 38.5 ℃、体积分数 5% CO₂、饱和湿度条件下培养 5 h。

(2) 传代牛胎儿睾丸 SCs 饲养层的制备。选择体外培养 72 h、处于对数生长期的原代牛胎儿睾丸 SCs,吸除培养液,并用 D-PBS 冲洗 3 次,加入消化

液(1 mL 2.5 g/L 胰蛋白酶+0.2 g/L EDTA),消化至 60% 细胞脱落,加入含体积分数 10% NBS 的 DMEM(高糖)终止消化,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清液,沉淀中加入 DMEM(高糖)调整细胞密度分别为 2×10⁴ 和 4×10⁴ mL⁻¹,接种于 24 孔培养板中,于 38.5 ℃、体积分数 5% CO₂、饱和湿度条件下培养 5 h。

1.2.5 牛体外受精卵与牛胎儿睾丸 SCs 饲养层的共培养 (1)原代和传代牛胎儿睾丸 SCs 饲养层与牛体外受精卵的共培养。分别将原代牛胎儿睾丸 SCs 饲养层和接种密度为 2×10⁴ mL⁻¹ 的传代牛胎儿睾丸 SCs 饲养层体外培养 5 h 后,用 SOF 培养液轻轻吹洗 3 次,洗去混杂于 SCs 间的、尚未贴壁的生殖细胞,然后加入 500 μL SOF 培养液,移入牛受精卵,共培养 7 d,每 48 h 半量换液 1 次,并观察牛受精卵的发育情况及 SCs 的生长情况。每组试验重复 8 次。

(2) 不同接种密度传代牛胎儿睾丸 SCs 饲养层与牛受精卵的共培养。2×10⁴ 和 4×10⁴ mL⁻¹ 两个接种密度的传代牛胎儿 SCs 饲养层与牛体外受精卵共培养的操作过程同 1.2.5(1),以培养液中无牛胎儿睾丸 SCs 饲养层为对照组。每组试验重复 8 次。

1.2.6 数据处理与统计分析 试验数据用 SPSS for Windows 13.0 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 牛胎儿睾丸 SCs 饲养层的制备结果

按照 1.2.4(1)中的方法,体外培养 5 h 后获得原代牛胎儿睾丸 SCs 饲养层。按照 1.2.4(2)中的方法,体外培养 72 h 的原代牛胎儿睾丸 SCs,在体外培养 5 h 后获得传代牛胎儿睾丸 SCs 饲养层。

2.2 原代和传代牛胎儿睾丸 SCs 饲养层与牛体外受精卵共培养的结果

原代和传代牛胎儿睾丸 SCs 饲养层与牛体外受精卵共培养的结果见表 1。

表 1 原代和传代牛胎儿睾丸 SCs 饲养层与牛体外受精卵共培养的结果

Table 1 Results of primary passage and secondary passage fetal bovine SCs feeder layer co-cultured with IVF zygotes in bovine

组别 Groups	受精卵数 No. of zygotes	卵裂率/% Cleavage rate	囊胚发育率/% Blastocyst development rate
原代牛胎儿睾丸 SCs 饲养层共培养组 Co-culture of the primary passage SCs feeder layer	120	69.2 a	16.7 A
传代牛胎儿睾丸 SCs 饲养层共培养组 Co-culture of the secondary passage SCs feeder layer	121	79.3 a	41.3 B

注:同列数据后标不同大写字母者表示差异极显著($P<0.01$),标相同小写字母者表示差异不显著($P>0.05$)。下表同。
Note:Numbers in same column signed by different capital letters show significant difference ($P<0.01$),Numbers in same column signed by same small letter show no difference($P>0.05$). The following table is same.

由表 1 可知,原代和传代牛胎儿睾丸 SCs 饲养层与牛体外受精卵共培养时,受精卵卵裂率差异不显著($P>0.05$),囊胚发育率差异极显著($P<0.01$)。

2.3 不同接种密度传代牛胎儿睾丸 SCs 饲养层与牛受精卵共培养的结果

不同接种密度传代牛胎儿睾丸 SCs 饲养层与

表 2 不同接种密度传代牛胎儿睾丸 SCs 饲养层与牛体外受精卵共培养的结果

Table 2 Results of IVF zygotes co-cultured with fetal bovine SCs feeder layer of different density in bovine

组别 Groups	受精卵数 No. of oocytes	卵裂率/% Cleavage rate	囊胚发育率/% Blastocyst development rate
对照组 Control Group	270	71.1 a	26.3 Bb
2×10 ⁴ mL ⁻¹ 牛胎儿睾丸 SCs 饲养层共培养组 Co-culture of 2×10 ⁴ SCs /mL	210	76.7 a	39.5 Aa
4×10 ⁴ mL ⁻¹ 牛胎儿睾丸 SCs 饲养层共培养组 Co-culture of 4×10 ⁴ SCs /mL	100	80.0 a	16.0 Cc

注:同列数据后标不同小写字母者表示差异显著($P<0.05$)。

Note: Numbers in same column signed by different small letters show different ($P<0.05$).

3 讨论与结论

本试验结果显示,与原代牛胎儿睾丸 SCs 饲养层相比,传代牛胎儿睾丸 SCs 饲养层与牛体外受精卵共培养,能够促进受精卵的分裂,极显著地提高囊胚发育率,牛胎儿睾丸 SCs 的这种作用可能与其分泌的多种蛋白及生长因子相关。研究表明,SCs 能分泌转铁蛋白、激活素、TGF- α 、TGF- β 、17 β -E2、IGF- I、层粘连蛋白(laminin)、IV 型胶原蛋白等多种蛋白及生长因子,这些蛋白及生长因子能够克服早期胚胎发育阻滞,促进胚胎体外发育及提高囊胚的质量。另外,目前研究已证实,SCs 具有免疫豁免作用^[14],提示与其共培养的胚胎在移植后,可能会减少机体免疫反应,降低免疫排斥引起的胚胎发育阻碍和流产。

本试验结果显示,原代牛胎儿睾丸 SCs 饲养层支持牛受精卵体外发育的效果远不如传代牛胎儿睾丸 SCs 饲养层,其原因一方面可能是原代 SCs 生长缓慢,形成饲养层时间过长;另一方面,根据 38.5℃条件下牛胎儿睾丸 SCs 的生长曲线可知,原代牛胎儿 SCs 从体外培养第 3 天开始进入对数生长期,第 5 天时饲养层开始形成,即原代牛胎儿睾丸 SCs 体外培养前 3 d 增殖缓慢,SCs 数量较少,而受精卵从单细胞到 2~8 细胞的分裂在 48 h 内完成,可能是由于此时低密度 SCs 分泌的有利于受精卵发育的细胞因子浓度低,促进受精卵发育的作用微弱;至细胞培养形成饲养层以后,分泌的细胞因子浓度增加,才开始具有较好地促进胚胎发育的作用。

牛受精卵共培养的结果见表 2。由表 2 可知,对照组、2×10⁴ 和 4×10⁴ mL⁻¹传代牛胎儿睾丸 SCs 饲养层共培养组的受精卵卵裂率分别为 71.1%,76.7%和 80.0%,差异不显著($P>0.05$);囊胚发育率分别为 26.3%,39.5%和 16.0%,差异极显著($P<0.01$)。

本研究中,传代牛胎儿睾丸 SCs 的接种密度为 2×10⁴ mL⁻¹,牛胎儿睾丸 SCs 饲养层与牛受精卵体外共培养时,胚胎各期发育情况均较好,说明传代牛胎儿睾丸 SCs 有促进牛体外受精胚胎发育的作用;传代牛胎儿睾丸 SCs 的接种密度为 4×10⁴ mL⁻¹,牛胎儿睾丸 SCs 饲养层与牛受精卵体外共培养时,胚胎第 2 天分裂情况较好,随着共培养的继续,已经发育的胚胎出现退化现象,继续发育的能力降低,囊胚发育情况很差。这可能是传代牛胎儿睾丸 SCs 接种密度为 4×10⁴ mL⁻¹时,最初 SCs 对胚胎发育起到一定的促进作用,但是随着共培养的继续,SCs 密度的进一步增加,会与胚胎竞争营养物质,从而使胚胎出现退化现象。

综上所述,低密度接种的传代牛胎儿睾丸 SCs 能有效促进牛体外受精卵的体外发育。

[参考文献]

[1] Lu R Z, Matsuyama S, Nishihara M, et al. Developmental expression of activin/inhibin beta A, beta B, and alpha subunits, and activin receptor-IIIB genes in preimplantation mouse embryos [J]. Biology of Reproduction, 1993, 49: 1163-1169.
[2] Dardik A, Schultz R M. Blastocoel expansion in the preimplantation mouse embryo: stimulatory effect of TGF- α and EGF [J]. Development, 1991, 113(3): 919-930.
[3] 赵兴绪. 兽医产科学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 49.
Zhao X X. Theriogenology [M]. Beijing: Chinese Agriculture Publishing Company, 2003: 49. (in Chinese)