

改进 V 形孔培养法对牛胚胎体外生产效果的影响

禹学礼^{1,2}, 栗颖华², 李国浩², 李晓霞², 咎林森¹

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100; 2 河南科技大学 动物科技学院, 河南 洛阳 471003)

[摘要] 【目的】探索 V 形孔培养法(WOW)、改进 V 形孔培养法(mWOW)和常规微滴培养法对牛胚胎体外生产效果的影响。【方法】将牛卵母细胞和受精卵分别采用常规微滴培养法(对照组)、WOW 和 mWOW 进行体外培养, 对照组每个微滴中置入 20~25 枚卵母细胞或胚胎, WOW 和 mWOW 组每个 V 形孔中置入 1 枚卵母细胞或胚胎, 计算卵裂率、囊胚率及受精后第 6, 7, 8 天的囊胚总细胞数和囊胚孵化率。【结果】mWOW 组的卵裂率、囊胚率及第 6, 7, 8 天囊胚的总细胞数、囊胚孵化率与常规微滴组差异不显著($P>0.05$), 但显著高于 WOW 组($P<0.05$); 3 个组第 6, 7, 8 天获得的囊胚总细胞数均呈逐渐下降的趋势。【结论】以 TCM-199 为基础培养液, 用 mWOW 可以完成牛胚胎体外生产的全过程, 且比 WOW 培养胚胎具有更强的发育能力和更好的质量。体外培养时, 发育越快的胚胎质量越高。

[关键词] V 形孔培养方法; 改进 V 形孔培养法; 牛; 胚胎; 体外生产

[中图分类号] S823.3⁺6

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2010)09-0032-05

Effects of the modified well of well culture system on the *in vitro* production of bovine embryos

YU Xue-li^{1,2}, LI Ying-hua², LI Guo-hao², LI Xiao-xia², ZAN Lin-sen¹

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

2 College of Animal Science and Technology, Henan University of Sci-Tech, Luoyang, Henan 471003, China)

Abstract: 【Objective】The research was to study the effects of the well of well system(WOW), the modified well of well system(mWOW) and drop system on the development potential and quality of *in vitro* produced bovine embryos. 【Method】The WOW, mWOW and drop were prepared before experiments. Bovine oocytes and presumptive zygotes were cultured in drop (control), WOW and mWOW systems respectively. About 20—25 oocytes or embryos were cultured in every one drop for control group. Only one oocyte or embryo was cultured in every V-shape well for WOW and mWOW groups. Cleavage rates, blastocyst rates and total cell number of embryos at 6, 7, and 8 days were examined. 【Result】There was no significant difference for cleavage rates, blastocyst rates and total cell number of embryos at 6, 7, and 8 days between mWOW and drop group ($P>0.05$). However, above indexes of both WOW and mWOW groups were higher ($P<0.05$) than that of WOW group. In addition, the total cell number at 6, 7, and 8 days for the three treatments all declined gradually. 【Conclusion】In conclusion, the whole process of bovine embryo *in vitro* production could be finished in the mWOW system, and had better development potential and quality than the WOW system in TCM-199 medium. The faster the embryos developed *in vitro* culture, the better the quality was.

* [收稿日期] 2010-03-02

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAD04A11); 农业科技跨越计划项目(2007-23); 洛阳市科技计划项目(030218, 0903036A)

[作者简介] 禹学礼(1963—), 男, 河南泌阳人, 在读博士, 主要从事动物胚胎生物技术研究。E-mail: yxl4282333@126.com

[通信作者] 咎林森(1963—), 男, 陕西扶风人, 教授, 博士生导师, 主要从事牛遗传育种研究。E-mail: Zanls@yahoo.com.cn

Key words: WOW;mWOW;bovine;embryo;*in vitro* production

在生产和科研中,将单个卵母细胞或早期胚胎分别培养具有重要的理论和应用价值。将源于遗传品质优秀个体的单个卵母细胞,通过体外成熟(*in vitro* maturation,IVM)、体外受精(*in vitro* fertilization,IVF)和胚胎体外培养(*in vitro* culture,IVC)进行胚胎体外生产,有利于品种资源保护和利用。对某一核移植胚胎进行单个分别培养,可以追踪其发育过程,得到更详细的发育过程信息。因此,Vajta 等^[1]开发了一种适于单个细胞培养的 V 形孔培养法(WOW),即在塑料培养皿的底部,用加热的针头烫出 V 形小孔,每个 V 形孔内放置 1 枚胚胎分别培养。但有研究证明,单个胚胎的培养效果劣于多个胚胎共同培养的效果^[2],其原因在于多个胚胎共同培养时,胚胎分泌的细胞因子之间互相有促进作用^[3]。为此,Daniela 等^[4]对 V 形孔培养法进行了改进,建立了改进 V 形孔培养法(The modified well of well system,mWOW),其方法是将数个 V 形孔用 1 个 400 μ L 微滴覆盖,既可以保证每个胚胎分别单个培养,又可以让胚胎分泌的细胞因子互相促进,提高胚胎培养效果。Vajta 等^[5]用 mWOW 培养体细胞核移植胚胎,经移植后获得了犊牛。Tagawa 等^[6]采用 mWOW 对体外生产的八细胞胚胎时期卵裂球在无透明带保护情况下进行培养,每 20 或 40 个 V 形孔上覆盖 1 个 100 μ L 的培养微滴,每个 V 形孔内置入 1 个卵裂球,获得了同卵双胞胎犊牛。

影响牛胚胎体外生产的因素很多,培养方法是其中的重要影响因素之一。目前,在培养方法的研究中,大多以胚胎的囊胚发育率作为衡量指标^[7]。已有研究表明,培养方法不但影响胚胎的产量,而且影响胚胎的质量,如囊胚的总细胞数以及囊胚的继续发育能力等。此外,受精后胚胎的发育速度与胚胎的质量也存在一定的相关性^[4]。因此,有必要进行不同 V 形孔培养法与胚胎质量、发育速度与胚胎质量的关系研究。

虽然 V 形孔培养法具有重要的理论和应用价值,但国际上相关的研究报道并不多,其培养效率尚待进一步探讨。在已有的报道中,V 形孔培养法仅用于早期胚胎的体外培养,在 V 形孔中是否可以完成牛胚胎体外生产的全过程,包括卵母细胞 IVM、IVF 和胚胎 IVC,还有待研究。为此,本研究以卵裂率、囊胚率、受精后第 6,7,8 天获得囊胚的总细胞数

和囊胚孵化率作为衡量指标,以常规微滴培养法作为试验对照^[8],探索 V 形孔培养法是否可以完成牛胚胎体外生产的全过程,比较 WOW 和 mWOW 在牛胚胎体外生产中的培养效果,并评价受精后不同时间获得囊胚的质量,旨在为利用 V 形孔法进行单个牛胚胎的体外生产提供依据。

1 材料与方法

1.1 卵巢及冷冻精液

牛卵巢采自河南省洛阳市春都清真牛羊屠宰有限公司,牛宰杀后 30 min 内取出卵巢,置于 30 $^{\circ}$ C 左右的保存液中,于 2 h 内运回实验室。卵巢保存液为:mPBS 液+20 mmol/L Hepes+300 IU/mL 青霉素+0.3 mg/mL 链霉素。

冷冻精液为河南洛阳白马寺种公牛站生产的西门塔尔牛细管冷冻精液。

1.2 主要试剂

TCM-199,购自 GiBco 公司;Pecoll 液,Pharmacia 公司产品;Hepes,华美生物工程公司生产;胎牛血清(FCS)、矿物油、咖啡因、肝素、透明质酸酶等试剂,均为 Sigma 公司产品。

1.3 试验设计

试验共重复进行 6 次,每次将采得的卵丘卵母细胞复合体(COCs)随机分为 3 组,即常规微滴组(对照组,CK)、WOW 组和 mWOW 组,对照组每个微滴中置入 20~25 枚卵母细胞或胚胎;WOW 和 mWOW 2 个试验组每个 V 形孔中,分别放入 1 枚卵母细胞或胚胎,所有组用同样的试验方法分别进行 IVM、IVF 和 IVC,并分别计算其卵裂率和囊胚率;受精后第 6,7,8 天(受精当天为 0 d)分别将囊胚从 IVC 微滴中拣出,取出部分囊胚染色并计算其各自的总细胞数,剩余的囊胚在与其原来 IVC 条件相同的条件下继续培养 72 h,分别计算第 6,7,8 天获得囊胚的孵化率。

1.4 试验方法

以河南科技大学动物胚胎工程实验室建立的 COCs 的 IVM、IVF 和 IVC 方法为基础进行试验。

1.4.1 牛卵母细胞的 IVM 常规方法分离 COCs,连同卵泡液放入培养皿中,置于体视显微镜下检卵,挑选细胞质均匀并包有 3 层以上致密卵丘细胞的卵母细胞供试验用。用冲卵液将 COCs 清洗 4 遍,根据试验设计分别置于微滴或 V 形孔中,在体积分数

5% CO₂、相对湿度 100%、39℃的培养箱中成熟培养 22~24 h,观察卵母细胞的成熟程度。试验所用冲卵液为:mPBS 液+4 g/L BSA+300 IU/mL 青霉素+0.3 mg/mL 链霉素;IVM 液为 TCM-199+25 mmol/L HEPES+体积分数 10% FCS+0.5 μg/mL FSH+10 μg/mL LH。

1.4.2 卵母细胞的 IVF 精子获能受精液为 BO 液+6 mg/mL BSA+10 μg/mL 肝素+5 mmol/L 咖啡因。在培养皿中分别制备 IVF 微滴(常规微滴和 2 种 V 形孔微滴),在 39℃的 CO₂ 培养箱中平衡 2 h 备用。用不连续密度梯度 Percoll 液和上游法筛选精子,用获能受精液调节精子浓度为 10⁷ mL⁻¹,放入 CO₂ 培养箱中备用。将成熟培养的 COCs 在受精液中清洗 4 遍,然后移入准备好的受精微滴中,加入 10~20 μL 准备好的精液,使微滴中精子最终浓度达 10⁶ mL⁻¹,在体积分数 5%CO₂、39℃的培养箱中精卵共同培养 10~12 h。

1.4.3 胚胎的 IVC 体外发育培养液配方为 TCM-199+25 mmol/L Hepes+体积分数 10% FCS,根据试验设计,在培养皿中分别制备 IVC 微滴(常规微滴和 2 种 V 形孔微滴),制作微滴时加入颗粒细胞单层(GCM),将其在微滴中的浓度调整为 10⁶ mL⁻¹,并提前 2 h 置于培养箱中备用。将体外受精 10~12 h 的受精卵在发育培养液中清洗 4 遍,然后移入发育培养液滴中,置于体积分数 5%CO₂、39℃的培养箱中培养,每 24 h 半量换液 1 次。受精后 2 d 统计卵裂率,分别于第 6,7,8 天统计囊胚数、总细胞数。

1.4.4 WOW 和 mWOW 微滴的制作 WOW 微滴的制作方法是,在塑料培养皿的底部,相距 1 cm 用加热的针头烫出 V 形孔,其孔径、深度分别约为

0.8 和 0.6 mm,容积约为 0.1 μL,在每个 V 形孔上覆盖一个 20 μL 的 TCM-199 微滴,最后上覆矿物油^[1]。mWOW 微滴制作方法是,在塑料培养皿的底部,相距 1 mm 用加热的针头烫出 V 形孔(大小同上),每 15~20 个 V 形孔上覆盖一个 400 μL 的培养微滴,最后上覆矿物油^[4]。

1.4.5 囊胚染色及总细胞数的统计 首先将囊胚置于 9 g/L 柠檬酸钠溶液中,作用 5~10 min;然后在 4℃条件下固定 1 min,固定液组成为 V(乙醇):V(乙酸):V(水)=3:2:1;将胚胎置于载玻片上,于空气中干燥后,固定 12 h,固定液组成为 V(乙醇):V(乙酸)=3:1;将固定好的胚胎再干燥 1 h,用 20 g/L 乙酸苅红素染色 10 min(或 100 g/L 姬姆萨染色 15 min)^[9]。最后,在显微镜下进行总细胞计数。

1.5 数据统计分析

数据以“平均数±标准误”表示,用 SPSS 11.0 统计软件进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 不同培养方法对牛 IVF 胚胎发育的影响

由表 1 可知,用 mWOW 进行体外成熟和体外受精后,卵裂率达 71.3%,用其进行胚胎体外培养后,囊胚率达 39.2%,且均与常规微滴组(对照组)的差异不显著($P>0.05$),与 WOW 组差异显著($P<0.05$),说明 mWOW 的效果明显优于 WOW。同时,本试验结果还表明,用 mWOW 可以完成胚胎体外生产的全过程;且 mWOW 既可以用于单个卵母细胞和胚胎的体外培养,又可以达到与常规微滴培养法相近的培养效果。

表 1 不同培养方法对牛 IVF 胚胎发育的影响(n=6)

培养方法 Method	总 COCs 数 No. of COCs	卵裂数 Cleavage	卵裂率/% Cleavage rate	囊胚数 Blastocyst	囊胚率/% Blastocyst rate
常规微滴 Drop	308	230	74.9±7.9 a	118	38.3±6.4 a
WOW	304	156	51.2±3.3 b	73	23.9±5.4 b
mWOW	309	219	71.3±9.2 a	120	39.2±7.2 a

注:同列数据后标不同小写字母者表示差异显著($P<0.05$)。下表同。
Note:Data in the same column with different superscripts differ significantly($P<0.05$). The same below.

2.2 不同培养方法对牛囊胚总细胞数的影响

表 2 表明,WOW 组第 6,7,8 天的囊胚总细胞数明显低于常规微滴组(对照组)和 mWOW 组($P<0.05$),而 mWOW 组与对照组之间差异不显

著,说明 mWOW 对囊胚发育具有明显的促进作用;此外,3 个组第 6,7,8 天的囊胚总细胞数均呈逐渐下降的趋势,说明在体外培养时,发育越快的胚胎质量越高。

表 2 不同培养方法对牛囊胚总细胞数的影响 (n=6)

Table 2 Effect of culture systems on total cell number of blastocysts in bovine (n=6)

培养方法 Method	不同时间获得的囊胚总细胞数 Total cell number		
	6 d	7 d	8 d
常规微滴 Drop	126.4±22.3 a	115.5±10.0 a	105.9±13.4 a
WOW	101.2±13.6 b	92.7±10.0 b	90.1±9.3 b
mWOW	122.4±21.2 a	115.4±18.8 a	108.9±19.6 a

2.3 不同培养方法对牛囊胚孵化率的影响

表 3 表明,WOW 组第 6,7,8 天获得的囊胚孵化率显著低于常规微滴组(对照组)和 mWOW 组 ($P<0.05$),而 mWOW 组与对照组之间差异不显

著,说明 mWOW 对囊胚的继续发育具有明显的促进作用;3 个组第 6,7 天获得的囊胚孵化率均高于第 8 天,说明在体外培养时,发育越慢的胚胎质量越差。

表 3 不同培养方法对牛囊胚孵化率的影响 (n=6)

Table 3 Effect of culture systems on hatching rate of blastocysts in bovine (n=6)

培养方法 Method	不同时间获得的囊胚孵化率 Hatching rate			%
	6 d	7 d	8 d	
常规微滴 Drop	43.2(19/44) a	43.5(10/23) a	28.6(6/21) a	
WOW	29.4(5/17) b	31.3(5/16) b	20.0(2/10) b	
mWOW	39.5(17/43) a	41.7(10/24) a	30.4(7/23) a	

3 讨 论

在牛胚胎体外生产中,越是优秀的母牛,其卵母细胞越是难以获得,常常会遇到采到 1 个或几个卵母细胞的情况,尽管数量很少,但十分珍贵;同时,通过单个细胞的分别培养可以追踪卵母细胞以及核移植胚胎的发育过程^[10-11]。

3.1 mWOW 可用于单个卵母细胞或胚胎的培养

单个卵母细胞和胚胎的培养效果一般比集群培养差,因为在集群培养过程中,不同细胞间互相促进^[12-13],使各种细胞因子的浓度达到更高水平^[14],以维持其正常发育。本试验各组卵母细胞和胚胎体外培养中,WOW 每 20 μL 微滴中仅有 1 个卵母细胞或胚胎;而常规微滴培养法和 mWOW 中,每个微滴中均有多个卵母细胞或胚胎,使其微环境中的细胞因子浓度比 WOW 高,从而促进了胚胎的发育,使常规微滴培养法和 mWOW 的囊胚发育率与囊胚总细胞数高于 WOW 组。因此,改进的 V 形孔法(mWOW)既可以用于单个卵母细胞和胚胎的分别培养,又可以保留常规微滴培养法集群培养的优势。表明单个卵母细胞或胚胎培养时,可以采用 mWOW,如将某一高产奶牛的 1 个或数个卵母细胞或胚胎,与其他来源的卵母细胞或胚胎,分别置于同一微滴中的不同 V 形孔中培养,既容易标记,又可以让彼此分泌的细胞因子互相促进,提高胚胎发育率和质量。

此外,在可供查阅的相关文献中,V 形孔法仅用

于早期胚胎的 IVC,而本研究是在 V 形孔中完成卵母细胞的 IVM、IVF 和胚胎的 IVC,即本研究首次用 V 形孔培养法完成了牛胚胎体外生产的全过程。

3.2 不同培养法对 IVF 胚胎囊胚总细胞数及囊胚发育率的影响

前人的研究已经证明,受精后胚胎的培养条件是决定胚胎质量的关键因素^[15-16]。因此,培养方法的改变可能会影响囊胚质量,表现为囊胚总细胞数的不同。本研究结果表明,mWOW 可以明显改进胚胎的质量。Daniela 等^[4]曾进行过与本研究相近的试验,其结果与本试验结果基本相符,但 mWOW 组与 WOW 组的囊胚率差异不显著,而本试验中 mWOW 组的囊胚率显著高于 WOW 组,其原因可能在于 Daniela 的试验中囊胚率均已达到了较高水平,mWOW、WOW 组和常规微滴组第 8 天的囊胚率分别达到 51.6%,51.6%和 57.2%,明显高于本试验中的 39.2%,23.9%和 38.3%,这似乎可以理解为,胚胎发育率较低时,mWOW 既可以提高囊胚发育率又可以提高囊胚质量,但当胚胎发育率达到较高水平时,mWOW 对胚胎的影响主要表现在提高囊胚质量上。

4 结 论

以 TCM-199 为基础培养液,用改进的 V 形孔培养法可以完成牛胚胎体外生产的全过程,且比 V 形孔法培养的胚胎具有更强的发育能力和更好的质量。体外培养时,发育越快的胚胎质量越高。

[参考文献]

- [1] Vajta G, Peura T T, Holm P, et al. New method for culture of zona-included or zona-free embryos: the well of the well (WOW) system [J]. *Mol Reprod Dev*, 2000, 55: 256-264.
- [2] Hendriksen P J M, Bevers M M, Dieleman S J. Single IVP using BRL cell co-culture and serum yields a lower blastocyst rate than group culture [J]. *Theriogenology*, 1999, 51: 319.
- [3] Leroy J, Vanholder T, Delanghe J, et al. Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum [J]. *Theriogenology*, 2004, 62: 1131-1143.
- [4] Daniela C P, Margot A N D, Rodolfo R. Evaluation of different culture systems on the *in vitro* production of bovine embryos [J]. *Theriogenology*, 2005, 63: 1131-1141.
- [5] Vajta G, Bartels P, Joubert J, et al. Production of a healthy calf by somatic cell nuclear transfer without micromanipulators and carbon dioxide incubators using the Handmade Cloning (HMC) and the Submarine Incubation System (SIS) [J]. *Theriogenology*, 2004, 62: 1465-1472.
- [6] Tagawa M, Matoba S, Narita M, et al. Production of monozygotic twin calves using the blastomere separation technique and well of the well culture system [J]. *Theriogenology*, 2008, 69: 574-582.
- [7] Hammon D S, Wang S, Holyoak G R. Effects of ammonia during different stages of culture on development of *in vitro* produced bovine embryos [J]. *Animal Reproduction Science*, 2000, 59: 23-30.
- [8] 禹学礼, 邓 雯, 庞有志, 等. 培养条件对牛卵母细胞体外受精后胚胎发育的影响 [J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2005, 33(8): 15-20.
- Yu X L, Deng W, Pang Y Z, et al. Effects of culture sytems on development competence of bovine oocytes following maturation, fertilization and culture *in vitro* [J]. *J of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry: Natural Science Edition*, 2005, 33(8): 15-20. (in Chinese)
- [9] Liu D J, Chan H W, Mal B, et al. The effects of different culture systems on the quality of Bovine *in vitro* fertilization embryos [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Uuniversitatis Neimongol*, 1997, 28(5): 692-697.
- [10] Oyamada T, Fukui Y. Oxygen tension and medium supplements for *in vitro* maturation of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined medium [J]. *J Reprod Dev* 2004, 50: 107-117.
- [11] Mizushima S, Fukui Y. Fertilizability and developmental capacity of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined maturation medium [J]. *Theriogenology*, 2001, 55: 1431-1445.
- [12] O'Doherty E M, Wade M G, Hill J L, et al. Effects of culturing bovine oocytes either singly or in groups on development to blastocysts [J]. *Theriogenology*, 1997, 48: 161-169.
- [13] Pereira D C, Dode M A N, Rumpf R. Evaluation of different culture systems on the *in vitro* production of bovine embryos [J]. *Theriogenology*, 2005, 63: 1131-1141.
- [14] Thibodeaux J K, Myers M W, Hansel W. The beneficial effects of incubating bovine embryos in groups are due to platelet-derived growth factor [J]. *Theriogenology*, 1995, 43: 336.
- [15] Rizos D, Ward F, Duffy P, et al. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality [J]. *Mol Reprod Dev*, 2002, 61: 234-248.
- [16] Rizos D, Gutierrez-Adan A, Perez-Garnelo S, et al. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression [J]. *Biol Reprod*, 2003, 68: 236-243.