

· 论 著 ·

小鼠早期胚胎几种不同培养方法的比较

丁 芳¹, 李志英¹, 周红林^{2△}, 杨世华³(1. 三峡大学仁和医院妇产科, 湖北宜昌 443001; 2. 昆明医学院第二附属医院妇科, 昆明 650101;
3. 中科院昆明动物所, 昆明 650223)

摘要:目的 探讨小鼠胚胎体外发育中的最佳培养方案。方法 将从超排的 ICR 雌鼠输卵管内收集的 1-细胞放入无糖 CZB 中培养, 分别于 2-细胞、4-细胞、桑椹胚阶段更换入含 3.0 mmol/L 葡萄糖(最适浓度)的 CZB 中, 以及胚胎培养全程均在含糖 CZB 中更换 1 次培养液、胚胎培养全程均在含糖 CZB 中不更换培养液, 对照组胚胎培养全程均在无糖 CZB 中, 观察记录胚胎的发育情况。结果 2-细胞、4-细胞阶段换入含糖 CZB 中的序贯培养及培养全程在含糖 CZB 中单一培养, 囊胚率均高于对照组 ($P < 0.05$); 桑椹胚阶段换入含糖 CZB 中的序贯培养, 囊胚率与对照组差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 2-细胞、4-细胞阶段换入含糖 CZB 中的序贯培养与全程在含糖 CZB 中的两步法单一培养及一步法单一培养, 囊胚率分别为 46.5%、38.4%、41.7%、56.6%, 其差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 在小鼠早期胚胎体外发育中, 2-细胞至桑椹胚前对葡萄糖存在依赖性; 尽管序贯培养是有效的, 但并不一定优于一步单一培养。

关键词: 小鼠; 早期胚胎; 培养方法; 葡萄糖; 序贯培养; 单一培养**中图分类号:** R321.4; R-332**文献标识码:** A**文章编号:** 1671-8348(2010)08-0907-03

Study on cultural method of mouse early embryos in vitro

DING Fang¹, LI Zhi-ying¹, ZHOU Hong-lin^{2△}, et al.

(1. Department of Gynecology and Obstetrics, Renhe Hospital of Three Gorges University, Yichang, Hubei 443001, China;

2. Department of Gynecology, 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming, Yunnan 650101, China;

3. Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming, Yunnan 650223, China)

Abstract: **Objective** To seek the appropriate way for the culture of mouse early embryos in vitro. **Methods** One-cell embryos were collected from the oviducts of ICR female mice, super-ovulated and cultured in glucose-free CZB. The embryos, respectively at two-cell, four-cell or morula stage, were removed from glucose-free CZB medium and placed in CZB medium supplemented with 3.0 mmol/L glucose (optimal concentration). The embryos in the other two groups were cultured in CZB supplemented with 3.0 mmol/L glucose during the entire culture time with or without renewal of medium. The embryos in the control group were continuously cultured in glucose-free CZB. Embryo development was recorded at 24 h, 48 h, 72 h and 96 h respectively culture. **Results** (1) Shift embryos from glucose-free CZB to glucose-containing CZB at two-cell or four-cell stage, the blastocyst rates significantly increased compared with the control group. (2) The blastocyst rates of which the embryos were continuously cultured in glucose-containing CZB during the entire culture time with or without renewal of medium, were significantly higher than that of the control group. (3) Shift embryos from glucose-free CZB to glucose-containing CZB at morula stage, the blastocyst rates did not increase compared with the control group. (4) The blastocyst rates, shift embryos from glucose-free CZB to glucose-containing CZB at two-cell or four-cell stage and continuously cultured in glucose-containing CZB during the entire culture time with or without renewal of medium, were 46.5%, 38.4%, 41.7% and 56.6% respectively, but there were no significant differences among groups. **Conclusion** Exposure of embryos to glucose, beginning at the two-cell and extending to the morula stage, is necessary for the development of ICR mouse embryos in vitro. Sequential Culture is sufficient, but is not necessarily superior to continuous Culture without renewal of medium.

Key words: mouse; early embryo; cultural method; glucose; sequential culture; continuous culture

随着人类辅助生殖技术、转基因、核移植、胚胎干细胞、基因打靶等生命科学领域高新技术的深入开展, 人们要求获得更多的囊胚率及更高质量的胚胎, 如何提高胚胎体外培养的囊胚率及胚胎的发育质量, 关键之一是改进胚胎体外培养条件使其更接近体内发育环境。目前, 改进哺乳动物胚胎体外培养主要采取以下方法: (1) 改进培养液成分; (2) 与体细胞或体细胞条件液共同培养; (3) 序贯培养。其中序贯培养近年来已成为研究的热点。

序贯培养是指按照体外培养胚胎在不同发育时期代谢需求的不同, 配制成一系列不同成分的培养液, 进行序列更换, 从

而延长胚胎在体外的培养时间, 增加体外筛查机会, 获得囊胚移植, 以期提高妊娠率的方法。胡泊等^[1]研究证实, 2-细胞期的小鼠胚胎经过序贯培养获得的 8-细胞期胚胎率、桑椹期胚胎率及囊胚率均显著高于单一培养组, 说明序贯培养方法的应用, 可以使具有发育潜能的优质胚胎增多, 从而使达到囊胚期的胚胎数增加。而 Biggers 等研究表明, 不更换培养基, 使用 KSOM^{AA} 培养基在体外培养 5 d, 其囊胚的产量与更换培养基无差别, 另有前瞻性随机研究, 比较单一复合培养(不包括共培养)和序贯培养对人类 IVF 囊胚发育的影响, 结果表明, 在囊胚形成率、植入率及妊娠率方面没有差别^[2]。目前序贯培养是

△ 通讯作者, 电话: 13577178497; E-mail: zhoxuy36@yahoo.com。

表 1 不同培养方法对 1-细胞小鼠胚胎体外发育的影响

组别	移入含糖 CZB 阶段	1-细胞胚胎数	胚胎数及百分率(%)			
			2-细胞	3-8 细胞	桑椹胚	囊胚
1	全程无糖	77	62(80.5)	56(72.7)	49(63.6)	0(0) ^a
2	2-细胞	86	74(86.0)	63(73.3)	50(58.1)	40(46.5) ^b
3	4-细胞	73	62(84.9)	50(68.5)	42(57.5)	28(38.4) ^b
4	桑椹胚	72	59(81.9)	52(72.2)	40(55.6)	6(8.3) ^a
5	全程有糖移动胚胎	72	61(84.7)	53(73.6)	40(55.6)	30(41.7) ^b
6	全程有糖未移动胚胎	76	64(84.2)	52(68.4)	50(65.8)	43(56.6) ^b

同一列上标字母不同表示差异有统计学意义($P < 0.05$)。

否优于单一培养意见不一。本研究将 ICR 小鼠 1-细胞胚胎分别放入无糖 CZB 及含糖 CZB 中进行单一培养和序贯培养,比较其差异性,以期获得一条稳定的早期胚胎体外培养途径。

1 材料与方法

1.1 材料 ICR 小鼠购自昆明医学院动物科,葡萄糖由美国 Sigma 公司提供,白色粉末;孕马血清促性腺激素(pregnant mare serum gonadotropin,PMSG)由宁波第二激素厂生产,每支 1 000 u,白色粉末;绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin,HCG)由瑞士雪兰诺大药厂生产,每支 5 000 u,白色粉末;配制 CZB 培养基和 CZB-HEPES 液的各试剂均购自美国 Sigma 公司,矿物油购自美国 Sigma 公司。

1.2 培养液 培养用的 CZB 培养基参照 Chatot 配方,CZB-HEPES 在 CZB 配方的基础上加入 HEPES-Na 20 mmol/L,NaHCO₃ 降至 5 mmol/L,BSA 用 PVA 代替,上述培养液用 0.22 μm 孔径的微孔膜过滤后放置 4 ℃ 冰箱储存备用。CZB 培养基与一定比例葡萄糖混合,配制成分含 3.0 mmol/L 葡萄糖的 CZB 培养液。

1.3 动物的超排 选取 6~8 周的 ICR 雌鼠和 8~10 周的 ICR 雄鼠,实验前雌鼠先腹部注射 10 u PMSG,间隔 46~48 h 腹部注射 10 u HCG,随后与雄鼠按 1:1 比例合笼交配,次晨检查阴栓,有阴栓者提示已交配。

1.4 胚胎的收集 在注射 HCG 后 22~26 h,将有阴栓的雌鼠用颈椎脱臼法处死,取 1-细胞胚胎定为第 1 天,75%乙醇消毒腹部后,打开腹腔,分离输卵管并除去黏附的血液和脂肪,剪下输卵管迅速将其置于预温的 hepes 液中,于解剖镜下用连有 1 mL 注射器的 5 号针头将输卵管壶腹部明显膨大处冲破,使胚胎流出,如果受精卵还被颗粒细胞包裹,用移液枪将胚胎移入透明质酸酶 300 u/mL 中,消化去除颗粒细胞,经 CZB-HEPES 洗涤 2 次,在 Nikon40 倒置显微镜下观察胚胎形态,挑选有第二极体或双原核的形态正常的受精卵用于体外培养。

1.5 胚胎培养 本实验采用微量滴法培养,每滴中按 10 个胚胎/20 μL 培养液的密度放置鼠胚。培养皿于培养前 1 d 准备,并放入 37 ℃、5%CO₂、饱和湿度的 CO₂ 培养箱中平衡一夜,从每只雌鼠中获得的胚胎均被平均分配到各组中,这样每个培养滴中含有多个雌鼠的胚胎。胚胎在 37 ℃、5%CO₂ 和饱和湿度的 CO₂ 培养箱中持续培养 96 h。

1.6 实验设计 在前期的工作中,作者前期对 CZB 培养基中碳水化合物(葡萄糖)作了一定的研究,发现葡萄糖对 ICR 小鼠胚胎体外发育起重要作用,在 CZB 培养基中,小鼠胚胎体外培养的最适葡萄糖浓度为 3.0 mmol/L,故选择葡萄糖的浓度为 3.0 mmol/L^[3]。将从 ICR 小鼠体内取出的 1-细胞胚胎按随机分组的原则分别放入以下各培养液中进行体外培养。实

验共分 6 组:1 组(对照组),胚胎培养全程均在不含葡萄糖的 CZB 培养液中。2 组,1-细胞至 2-细胞阶段在无糖 CZB 培养基中,2-细胞至囊胚阶段移入含 3.0 mmol/L 葡萄糖的 CZB 中培养;3 组,1-细胞至 4-细胞阶段在无糖 CZB 培养基中,4-细胞至囊胚阶段移入含 3.0 mmol/L 葡萄糖的 CZB 中培养;4 组,1-细胞至桑椹胚阶段在无糖 CZB 培养基中,桑椹胚至囊胚阶段移入含 3.0 mmol/L 葡萄糖的 CZB 中培养;5 组,地胚胎培养全程在含 3.0 mmol/L 葡萄糖的 CZB 培养液中,1~5 组在体外均更换一次培养液,更换培养液时移动一次胚胎,移动胚胎时勿将胚胎遗失;6 组,胚胎培养全程均在含 3.0 mmol/L 葡萄糖的 CZB 培养液中,培养全程不更换培养液,无胚胎移动。2~6 组为实验组,具体操作见图 1。每组胚胎均在体外培养 96 h,观察 2-细胞率、4-细胞率、桑椹胚率、囊胚率。

1.7 统计学方法 采用 SPSS11.5 统计学软件包,对各阶段发育率的比较采用卡方检验。

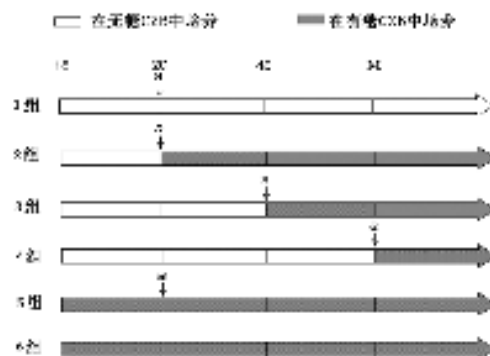


图 1 不同培养阶段更换培养液培养小鼠早期胚胎的示意图

2 结果

不同的培养方法对 1-细胞小鼠胚胎体外发育的影响。2-细胞、4-细胞阶段从无糖 CZB 更换到含糖 CZB 中的序贯培养,囊胚率高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);培养全程均在含糖 CZB 中,其中更换一次培养液的单一培养囊胚率高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);培养全程均在含糖 CZB 中,不更换培养液的单一培养囊胚率高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);桑椹胚阶段从无糖 CZB 中更换到含糖 CZB 中的序贯培养,囊胚率与对照组差异无统计学意义($P > 0.05$)。各实验组 2-细胞率、3-8 细胞率、桑椹胚率与对照组及各实验组间差异均无统计学意义($P > 0.05$)。2-细胞、4-细胞更换培养液的序贯培养与培养全程在含糖 CZB 中的单一培养囊胚率差异无统计学意义($P > 0.05$);培养全程均在含糖 CZB 中移动一次胚胎的单一培养与培养全程均在含糖 CZB 中不移

动胚胎的单一培养囊胚率差异无统计学意义($P>0.05$)。具体结果见表 1。

3 讨论

3.1 不同阶段葡萄糖对胚胎发育的影响 更新培养基的原因之一是在培养的某一阶段除去某些有害物质,比如氨;另一个原因是考虑到胚胎植入前生理和代谢方面的重要变化。第二考虑依赖于两个假说。第一个假说认为,当植入前胚胎从输卵管向子宫移动的过程中其内环境发生了变化。这个假说现存的证据是 Gardner^[4]和 Lane^[5]关于非妊娠妇女输卵管液及子宫液中葡萄糖和丙酮酸的分析资料。该研究资料显示,在人类输卵管液中,葡萄糖浓度随着月经周期的循环而变化,卵泡阶段是 3.11 mmol/L,月经中期降到 0.50 mmol/L,黄体期升至 2.32 mmol/L;子宫液中葡萄糖的浓度恒定为 3.15 mmol/L。输卵管液中丙酮酸的浓度恒定于 0.24 mmol/L,子宫液中丙酮酸的浓度恒定于 0.1 mmol/L。第二个假说认为,随着胚胎的代谢,胚胎所处环境中的化学成分发生了变化。这个假说的理论基础是,在动物模型和人类胚胎的早期发育中,丙酮酸的利用超过葡萄糖,而到桑椹胚阶段,恰恰相反,葡萄糖的利用超过丙酮酸。优先利用葡萄糖或丙酮酸似乎由于输卵管液与子宫液中葡萄糖和丙酮酸浓度上的差异造成。但这种解释缺乏严密性,因为它忽略了一点,只要环境中所给化学成分浓度在允许的范围内,胚胎可能从中选择性地利用其所需要的化学成分。

本实验将 ICR 小鼠 1-细胞胚胎单一培养于无糖 CZB 与含糖 CZB 中,同时序贯培养于无糖 CZB 及含糖 CZB 中,分别观察各自的发育情况。研究结果显示:2-细胞、4-细胞更换入含糖 CZB 中的序贯培养囊胚率显著高于无糖 CZB 组,而与单一培养于含糖 CZB 组中差异无统计学意义。桑椹胚阶段更换入含糖 CZB 中的序贯培养囊胚率明显低于在含糖 CZB 组中的单一培养,而与无糖 CZB 组差异无统计学意义。该结果提示,除了丙酮酸、乳酸作为胚胎发育的重要能量底物之外,葡萄糖也是重要的能量物质或者对胚胎早期发育存在重要支持,它对胚胎的卵裂和囊胚的形成有很大影响。葡萄糖究竟于何阶段起作用及其作用如何? 本实验显示,2-细胞、4-细胞以后补充葡萄糖,囊胚率显著提高,仅仅于桑椹胚及以后阶段添加葡萄糖无法逆转胚胎发育,囊胚形成率很低,提示小鼠胚胎体外发育在 2-细胞以后桑椹胚前对葡萄糖存在依赖性,此时培养液中补充葡萄糖是必要的。2-细胞以后添加葡萄糖囊胚率增加,可能由于胚胎早期卵裂主要依靠丙酮酸和乳酸供能,2-细胞以后随着卵裂速度加快,胚胎逐步动用葡萄糖,此时胚胎基因组由母源性调控转移到合子型调控,葡萄糖能量代谢途径开放,故 2-细胞以后添加葡萄糖是必要的。然而,胚胎致密化后即桑椹胚阶段再补充葡萄糖为时已晚,囊胚率仍很低。可能的原因有:(1)在无糖的情况下,胚胎主要利用丙酮酸及乳酸代谢供能,但这种能量供给是有限的,若无其他能量物质替代只能支持胚胎发育到桑椹胚,不能支持胚胎后期的发育;(2)桑椹胚阶段加糖仍不能补救,可能由于桑椹胚期葡萄糖代谢途径受限,也可能由于囊胚的形成必须通过提前代谢葡萄糖储备某些物质,其具体的机制有待进一步研究。

3.2 序贯培养与单一培养对小鼠早期胚胎体外发育的影响

早期人们对于序贯培养认识尚不深刻,自从用于成功培养人类合子至囊胚阶段的连续培养液 G1、G2 出现^[5](G1 培养液是为了支持到 8-细胞阶段的发育,G2 培养液是为了支持 8-细胞阶段到囊胚的发育),序贯培养受到研究者的密切关注。由于序贯培养有利有弊,利在胚胎发育的不同时期对不同物质的需求,弊在胚胎体外培养过程中反复的体外操作可能对胚胎发育造成影响。因此,不少研究者力求在单一培养上有所突破。

为进一步研究比较序贯培养与单一培养的差异,本研究结果显示,一步法全程含糖培养的囊胚率最高,序贯培养囊胚率均有所下降,表明在本研究范围内,序贯培养似乎不能改善胚胎最终的发育结局。该结论并不支持胡泊等的研究,造成上述差异的原因可能与小鼠的品系、培养液的成分、样本量的大小、胚胎培养时期、试剂来源等不同相关。Swain 等^[6]研究证实,葡萄糖对哺乳动物胚胎早期发育没有抑制作用,故一开始就加入葡萄糖的单一培养并不影响胚胎的发育。本实验也验证了这一结论,2-细胞、4-细胞阶段开始添加葡萄糖的序贯培养并不能提高小鼠胚胎体外培养的囊胚率。

另一方面,一步单一培养及两步单一培养的囊胚率分别为 56.6%、41.7%,其囊胚获得率偏低(一般应大于 80%),可能与自配的培养液有关。虽然两组差异无统计学意义,但相关的数据表明,两步单一培养囊胚率有所下降,说明移动胚胎对胚胎体外发育还是造成一定影响,尚且移动胚胎后胚胎质量有否受损目前尚不明确。由于序贯培养同样需要进行移动胚胎的操作,移动胚胎既增加了体外的操作又可能对胚胎发育造成影响,因此,序贯培养虽然是有效的,但并不一定优于一步单一培养。

参考文献:

- [1] 胡泊,孙云霞,史敏,等.序贯培养对小白鼠胚胎体外发育的影响[J].新疆医科大学学报,2003,26(4):368.
- [2] Macklon NS, Pieters MH, Hassan MA, et al. A prospective randomized comparison of nsequential versus monoculture systems for in-vitro human blastocyst development[J]. Hum Reprod, 2002, 17: 2700.
- [3] 丁芳,周红林,刘洋,等.葡萄糖对 ICR 小鼠胚胎体外发育的影响[J].动物学研究,2007,28(5):501.
- [4] Gardner DK, Lane M, Calderon I, et al. Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells[J]. Fertil Steril, 1996, 65: 349.
- [5] Gardner DK, Lane M. Culture and selection of viable human blastocysts: a feasible proposition for human IVF. Hum[J]. Reprod Update, 1997, 3: 367.
- [6] Swain JE, Bormann CL, Clark SG, et al. Use of energy substrates by various stage preimplantation pig embryo produced in vivo and in vitro[J]. Reproduction, 2002, 123: 253.

(收稿日期:2009-08-05 修回日期:2009-09-28)