

不同培养液对昆明小鼠体外受精率及

早期胚胎体外发育的影响

吴嫦丽, 张守全, 高淑静, 江青艳, 冯定远

(华南农业大学动物科学学院, 广东 广州 510642)

摘要: 在TYH受精液中添加促卵泡素(FSH)和苯甲酸雌二醇(E₂), 检测不同浓度的FSH和E₂对昆明小鼠的体外受精率的影响; 检测在M16、CZB两种培养液中添加胎牛血清(FCS)与否对昆明小鼠早期胚胎体外发育的影响。结果表明: 在TYH中添加1.0 IU/mL FSH, 受精率和2-细胞胚率显著高于对照组; 在TYH中添加0.1 μg/mL E₂, 受精率和2-细胞胚率也显著高于对照组。在CZB中添加体积分数为10% FCS, 可显著减少2-细胞期体外发育阻断, 并显著提高小鼠胚胎体外发育的囊胚率, 可见, 以TYH添加1.0 IU/mL FSH和0.1 μg/mL E₂为受精液, 以含体积分数为10% FCS的CZB为胚胎培养液, 小鼠胚胎可获得较高的囊胚率。葡萄糖并不是小鼠胚胎形成囊胚所必需的。

关键词: 昆明小鼠; 体外受精; 早期胚胎; 体外发育

中图分类号: Q954.4 文献标识码: A 文章编号: 1001-411X(2006)01-0107-03

Effects of Culture Media on Rate of Fertilization and Development of Early Embryos in Mice in vitro

WU Chang-li, ZHANG Shou-quan, GAO Shu-jing, JIANG Qing-yan, FENG Ding-yuan

(College of Animal Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: To determine whether efficiency of fertilization in vitro could be improved by estrogen (E₂) or follicle stimulating hormone (FSH), different concentrations of E₂ (0.1, 0.5 or 1.0 μg/mL), or FSH (0.1, 0.5, 1.0 IU/mL) were tested in the medium TYH. Kunming mouse early embryos were cultured in four media [M16, M16 + 10% (ψ) FCS, CZB, CZB + 10% (ψ) FCS] in vitro. The fertilization rate and 2-cell embryo rate were significantly higher in 1.0 IU/mL FSH and 0.1 μg/mL E₂ than controls. Two-cell embryo block of development in vitro was overcome and the blastocyst formation rate was higher in CZB + 10% (ψ) FCS than in other media. The results showed that glucose is unnecessary for the embryo to form blastocyst.

Key words: Kunming mouse; fertilization; early embryo; in vitro

哺乳动物的体外受精、胚胎体外培养技术发展至今已经取得了巨大的进展, 然而体外受精仍存在受精率不高、结果不稳定现象, 胚胎体外培养还存在体外发育的阻断、囊胚率低等问题^[1]。在哺乳动物卵子成熟液中添加促卵泡素(FSH)或雌激素, 可以提高哺乳动物卵母细胞的体外成熟率及体外受精率^[2-3], 但试验结果尚不稳定。为克服上述问题, 本试验以昆明小鼠为动物模型, 研究小鼠的体外受精、早期胚胎的体外培养, 以期建立小鼠体外受精及早期

胚胎体外培养的理想体系。

1 材料与方法

1.1 实验动物

昆明小鼠购自广东省实验动物中心。

1.2 昆明小鼠的超排处理

性成熟昆明母鼠, 腹腔注射 PMSG, 15 IU/只; 48 h后, 腹腔注射 hCG 15 IU/只。为获得卵子用于体外受精的母鼠, 不与公鼠合笼; 为获得早期胚胎用于

收稿日期: 2004-11-04

作者简介: 吴嫦丽(1980-), 女, 硕士; 通讯作者: 张守全(1964-), 男, 教授, 博士, E-mail: sqzhang@scau.edu.cn

基金项目: 广东省自然科学基金(04020611); 广东省教育厅自然科学基金(Z03005)

体外培养,母鼠与公鼠同笼过夜,次日早晨检查母鼠阴道栓,有阴道栓者,用于冲取胚胎.

1.3 精子的收集与获能

取性成熟公鼠的附睾尾精子,于 37 ℃、 $\varphi(\text{CO}_2)$ = 5%、饱和湿度的培养箱内孵育 1 ~ 2 h,50 $\mu\text{g/mL}$ 肝素钠使精子获能.

1.4 体外受精

取在 37 ℃ 的 CO_2 培养箱温育 1 ~ 2 h 已获能的精子悬液,加入置有成熟卵子的 TYH 受精液. 调整精子密度约 100 条/ μL . 置于培养箱受精,6 h 后将受精卵移至 CZB 液中培养.

1.5 小鼠早期胚胎的体外培养

超排母鼠,与公鼠合笼有阴道栓者,以颈部脱臼法处死,取出卵巢和输卵管冲胚. 早期胚胎分别以 M16、M16 + 10% (φ) FCS、CZB、CZB + 10% (φ) FCS 为培养液,置于 $\varphi(\text{CO}_2)$ = 5%,37 ℃,饱和湿度的培养箱内培养.

1.6 数据分析

数据采用百分数显著性 t 检验.

2 结果

2.1 不同浓度的 FSH 对小鼠受精率和 2-细胞胚率的影响

在 TYH 受精液中加入不同浓度的 FSH,对小鼠卵母细胞体外受精率和 2-细胞胚率的影响结果见表 1. 1.0 IU/mL FSH 组受精率和 2-细胞胚率最高,且显著高于对照组.

2.2 不同质量浓度的雌二醇对小鼠体外受精率和 2-细胞胚率的影响

在 TYH 受精液中加入不同质量浓度的苯甲酸雌二醇(E_2),对小鼠卵母细胞体外受精率和 2-细胞胚率的影响结果见表 2. 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 的 E_2 获得最高的体外受精率和 2-细胞胚率,皆显著高于对照组.

2.3 小鼠 2-细胞期胚胎的体外培养

注射 hCG 后的 42 ~ 48 h,输卵管获得 2-细胞期胚胎. 胚胎培养板内培养,每个培养孔内加 0.5 mL 培养液,放置 25 ~ 50 个胚胎. 所用培养液为 M16、M16 + 10% (φ) FCS、CZB、CZB + 10% (φ) FCS. 小鼠 2-细胞胚胎在 4 种培养液中,发育到 4-细胞率、8-细胞率、桑椹胚率和囊胚率以 CZB + 10% (φ) FCS 组最高(表 3),显著高于其他各组. 可见 CZB 中加入 10% (φ) FCS 可获得较高的囊胚率.

表 1 不同浓度的 FSH 对小鼠体外受精率和 2-细胞胚率的影响¹⁾

Tab. 1 Effects of different concentrations of FSH on fertilization rate and 2-cell embryo rate in mouse *in vitro*

组别 groups	卵子数 number of ova	受精率 fertilization rate/%	2-细胞胚率 2-cell embryo rate/%
TYH + FSH(1.0 IU/mL)	142	78.06b	68.61b
TYH	132	74.24a	65.91a
TYH + FSH(0.5 IU/mL)	146	70.54a	64.38a
TYH + FSH(0.1 IU/mL)	148	69.21a	63.49a

1) 同列具不同字母标注者,差异显著($P < 0.05$, t 检验)

表 2 不同质量浓度的 E_2 对小鼠体外受精率和 2-细胞胚率的影响¹⁾

Tab. 2 Effects of different mass concentrations of E_2 on fertilization rate and 2-cell embryo rate in mouse *in vitro*

组别 groups	卵子数 number of ova	受精率 fertilization rate/%	2-细胞胚率 2-cell embryo rate/%
TYH + E_2 (0.1 $\mu\text{g/mL}$)	150	82.00b	74.67b
TYH	132	74.24a	65.91a
TYH + E_2 (0.5 $\mu\text{g/mL}$)	156	67.94c	57.69c
TYH + E_2 (1.0 $\mu\text{g/mL}$)	137	51.82d	45.25d

1) 同列具不同字母标注者,差异显著($P < 0.05$, t 检验)

表 3 昆明小鼠 2-细胞胚胎在不同培养液的体外培养结果¹⁾

Tab. 3 Results of culturing 2-cell embryos of Kunming mice in different media *in vitro*

培养液 media	2-细胞胚胎数 number of 2-cell embryos	4-细胞率 4-cell embryo rate/%	8-细胞率 8-cell embryo rate/%	桑椹胚率 morula rate/%	囊胚率 blastocyst rate/%
CZB + 10% (φ) FCS	255	85.89c	77.65c	65.49c	23.92c
M16 + 10% (φ) FCS	163	73.01b	41.72b	17.18a	4.91a
M16	194	66.49a	31.96a	13.40a	3.09ab
CZB	154	62.34a	25.97a	1.95b	0b

1) 同列具不同字母标注者,差异显著($P < 0.05$, t 检验)

2.4 小鼠 4-细胞期胚胎的体外培养

注射 hCG 后的 48 ~ 60 h,输卵管获得 4-细胞期胚胎用于培养,每个培养孔内加 0.5 mL 培养液,放置 25 ~ 50 个胚胎. 所用培养液为 M16、M16 + 10%

(φ) FCS、CZB、CZB + 10% (φ) FCS. 小鼠 4-细胞胚胎在 4 种培养液中,发育到 4-细胞率、8-细胞率、桑椹胚率和囊胚率以 CZB + 10% (φ) FCS 组最高,显著高于其他各组(表 4). 可见 CZB 中加入 10% FCS(φ)可

获得较高的囊胚率。

表4 昆明小鼠4-细胞胚胎在不同培养液的体外培养结果¹⁾

Tab. 4 Results of culturing 4-cell embryos of Kunming mice in different media *in vitro*

培养液 media	4-细胞胚胎数 number of 4-cell embryos	桑椹胚率 morula rate/%	囊胚率 blastocyst rate/%
CZB + 10% (φ) FCS	327	94.19c	80.12c
M16 + 10% (φ) FCS	283	91.52a	57.95a
M16	297	90.23a	55.56ab
CZB	251	87.25b	52.99b

1) 同列具不同字母标注者,差异显著($P < 0.05$, t 检验)

3 讨论

3.1 小鼠卵母细胞的体外受精

FSH 常用于卵母细胞体外成熟培养,张文红等^[4]研究 FSH 和 HMG 对小鼠的卵母细胞体外成熟的影响,发现适当浓度的 HMG 比 FSH 对卵泡的生长更有利。在成熟培养液中添加 FSH 可以提高哺乳动物卵母细胞的体外成熟率及体外受精率^[2,5-6]。本试验在 TYH 受精液中添加 1.0 IU/mL FSH,受精率和 2-细胞胚率显著高于对照组。该结果与张嘉宝等^[3]在 TYH 中添加 FSH,可显著提高昆明小鼠的体外受精率的结果一致。

E_2 对卵母细胞体外成熟的影响结果不太一致。早期报道 E_2 显著减少小鼠、兔、牛卵母细胞的成熟^[7]。近年来,多数学者认为 E_2 促进卵母细胞胞质的成熟,并促进成熟分裂复始,如崔亚利等^[5]研究发现 1 $\mu\text{g/mL}$ E_2 可提高牛卵母细胞的体外成熟率。本试验在 TYH 液添加 0.1 $\mu\text{g/mL}$ E_2 可显著地提高小鼠体外受精率;随着 E_2 添加量的增加,受精率有下降趋势。 E_2 对牛和小鼠卵母细胞体外成熟作用可能存在浓度差异。

3.2 小鼠早期胚胎的体外培养

CZB 可以克服小鼠胚胎体外发育的 2-细胞期阻断,不含葡萄糖的 CZB 却不能支持胚胎发育到囊胚阶段^[8]。早期胚胎以丙酮酸盐为主要能量物质,直到囊胚期,才以葡萄糖为主要的能量物质^[9]。桑椹胚于含葡萄糖的培养液中,可利用葡萄糖;而桑椹胚于不含葡萄糖的培养液中,对丙酮酸盐的利用显著增加^[10]。可以推断早期胚胎在不同的培养条件下,对能量的利用是随着培养条件的改变而改变的。

培养液中添加胎牛血清,在保持胚胎细胞的存活、促进生长、维持细胞 pH 及渗透压、增加细胞弹性以及细胞膜的完整性等方面都发挥着重要作用,但胎牛血清组成复杂,含有生长因子、激素、维生素、矿物质、细胞因子以及其他未知因子。Wang 等^[11]比较 FBS 和 BSA 对牛胚胎体外培养的作用,发现 FBS 的

囊胚率高于 BSA。van Langendonck 等^[12]发现 FCS 促进牛早期胚胎的体外发育。张嘉保等^[3]在小鼠胚胎体外培养液中添加 FCS,也显著提高了胚胎的发育。本试验在不含葡萄糖的 CZB 培养液中加入胎牛血清也获得较高的囊胚率,可以推断葡萄糖对于小鼠囊胚的形成并非必不可少。

参考文献:

- [1] 徐平,山村绫子,唐一岷,等. 不同品系小鼠的体外受精、胚胎冷冻及移植的比较研究[J]. 中国实验动物学报, 2004, 12(3): 147-151.
- [2] 乌日琴,邓新燕,陈颖青,等. 小鼠卵母细胞体外成熟、体外受精的效果观察[J]. 中国实验动物学报, 1999, 7(2): 81-85.
- [3] 张嘉保,任文陟,宋德光,等. 小鼠体外受精、胚胎培养及胚胎快速冷冻的研究[J]. 中国实验动物学报, 2002, 10(2): 108-112.
- [4] 张文红,朱伟杰,钟瑜,等. 两种激素对小鼠初级卵泡体外成熟培养的实验研究[J]. 中国病理生理杂志, 2002, 18(7): 853-854.
- [5] 崔亚利,桑润滋. 牛卵母细胞体外成熟及体外受精的研究[J]. 河北农业大学学报, 1999, 22(1): 67-70.
- [6] BING Y Z, NAGA T, RODRIGUEZ-MARTINEZ H. Effects of cysteamine, FSH and estradiol-17 beta on *in vitro* maturation of porcine oocytes [J]. Theriogenology, 2001, 55(4): 867-876.
- [7] FUKUL Y, FUKUSHIMA M, TERAWAKI Y, et al. Effect of gonadotropins, steroids and culture media on bovine oocyte maturation *in vitro* [J]. Theriogenology, 1982, 18: 161-175.
- [8] CHATOT C L, ZIOMEK C A, BAVISTER B D, et al. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos *in vitro* [J]. J Reprod Fertil, 1989, 86(2): 679-688.
- [9] HOUGHTON F D, THOMPSON J G, KENNEDY C J, et al. Oxygen consumption and energy metabolism of the early mouse embryo [J]. Mol Reprod Dev, 1996, 44(4): 476-485.
- [10] MARTIN K L, LEESE H J. Role of glucose in mouse pre-implantation embryo development [J]. Mol Reprod Dev, 1995, 40(4): 436-443.
- [11] WANG S, LIU Y, HOLYOAK G R, et al. The effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on the development of pre- and post cleavage-stage bovine embryos cultured in modified CR2 and M199 media [J]. Anim Reprod Sci, 1997, 48(1): 37-45.
- [12] van LANGENDONCKT A, DONNAY I, SCHUURBIERS N, et al. Effects of supplementation with fetal calf serum on development of bovine embryos in synthetic oviduct fluid medium [J]. J Reprod Fertil, 1997, 109(1): 87-93.

【责任编辑 柴 焰】