

昆明小鼠单细胞胚胎体外培养的研究

张守全

(畜牧系)

孙拓

(北京农业大学畜牧系)

摘要 本试验研究了葡萄糖、EDTA 和小鼠血清对昆明小鼠单细胞胚胎体外发育的影响。结果发现:不含葡萄糖 HECM-1 组桑椹率为 40.05%, 对照组为 8.14%; 含 EDTA 的 CZB 组桑椹率为 61.18%, 对照组为 47.44%; 小鼠血清对昆明小鼠单细胞胚胎体外发育无促进作用。可见, 葡萄糖抑制昆明小鼠单细胞胚胎体外发育; 在不含葡萄糖的条件下, EDTA 支持小鼠早期胚胎体外发育; 无论有无葡萄糖小鼠血清对小鼠早期胚胎体外发育无促进作用。

关键词 昆明小鼠; 单细胞胚; 葡萄糖; EDTA; 小鼠血清; 体外培养

已研究过的数种哺乳动物的早期胚胎几乎都存在体外发育阻断 (blocks to development) 现象。诸如随机交配品系小鼠 2-细胞(如昆明小鼠)、牛、羊 8~16 细胞、猪 4-细胞阶段等^[1]。但是, 体外受精、胚胎分割、胚胎性别鉴定、核移植和基因导入等高科技操作的胚胎, 尚需在体外培养到适当阶段, 才便于植入受体生殖道中。这就要求人们设法克服胚胎体外发育的阻断现象, 提高胚胎移植成功率。研究者已从两个方面试图解决这一难题: 一是利用某些体细胞与早期胚胎协同培养^[2,3,4,5,6], 二是改进培养液成份, 尽量满足早期胚胎发育所需物质和确定并减除对其发育不利的成份^[7,8,9]。本试验主要观察培养液中葡萄糖、EDTA、小鼠血清对表现为体外发育 2-细胞阻断昆明小鼠胚胎体外培养的影响, 找出昆明小鼠单细胞胚胎体外培养较理想的培养液, 为解决家畜早期胚胎体外发育阻断现象提供研究思路与参考的方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物 体成熟昆明小鼠 (提供单细胞胚胎): 购自北京大学生物系。

1.2 小鼠原核胚的获得

1.2.1 小鼠的超排处理 体成熟的昆明小鼠, 腹腔注射 PMSG 10 IU, 48 h 之后, 腹腔注射 HCG 10 IU, 同时放入公鼠笼交配过夜, 次日晨 8:00 检查阴道栓, 有阴道栓者, 自注射 HCG 25~27 h 后冲卵用于试验^[10,11]。

1.2.2 冲卵 以颈椎脱臼法处死小鼠, 腹部消毒后, 剖腹取出输卵管和卵巢, 剪除脂肪, 用 4 号注射针头连接 1 ml 注射器 (内有 0.5 ml HEPES-TALP) 冲卵, 将针头插入输卵管伞部开口, 注入培养液, 即可冲出受精卵。如果有细胞包被受精卵, 用 300 IU/ml 透明质酸酶消化除去细胞团, 再用培养液冲洗受精卵 3~5 次。选择形态正常的受精卵用于培养。

1.2.3 胚胎的液滴培养 取 0.1 ml 培养液, 在培养皿 (直径 35 mm) 内制备液体小滴, 再覆盖以灭菌的液体石蜡, 在使用前置入 5% CO₂、37℃ 二氧化碳培养箱平衡 1 h, 每个培养皿放置受精卵 20 个左右, 在上述条件下培养。

· 国家自然科学基金资助项目

1992-07-08 收稿

1.2.4 培养液 CZB^[7]、TALP^[12]、Hepes-TALP^[13]、HECM-1^[11] 均按文献由本试验室配制。小鼠血清自制。

2 试验结果

2.1 葡萄糖对小鼠单细胞胚胎体外发育的影响

HECM-1^[11]是含 20 种氨基酸而不含葡萄糖和磷酸盐,可克服金黄仓鼠 2 细胞阻断的培养液,在此基础上添加 5.0 mM 葡萄糖,将氯化钠的浓度由 98.0 mM 减至 95.5 mM,保持等渗,从而构成 G-HECM-1。分别以含葡萄糖 TALP、G-HECM-1 为对照组,不含葡萄糖的 CZB、HECM-1 为试验组,采用液滴方法培养小鼠单细胞胚胎,结果见表 1。

表 1 葡萄糖对小鼠单细胞胚胎体外发育影响

组 别	入培数	第一次卵裂率%	大于 2 细胞胚率%	桑椹胚率%
TALP	90	51.11 a	17.78 c	6.67 f
CZB	152	81.58 b	67.11 e	61.18 h
G-HECM-1	86	75.58 b	20.93 c	8.14 f
HECM-1	168	79.76 b	51.19 d	40.05 g

注:同一整栏用相同字母标注者差异不显著 ($P>0.05$); a vs b、c vs d、d vs e、f vs g、g vs h 差异极显著 ($P<0.01$)。

由表 1 可见, TALP、G-HECM-1 两组,在克服 2 细胞阻断率和桑椹率两指标,都极显著低于 CZB 和 HECM-1 组。可见,培养液中葡萄糖抑制昆明小鼠单细胞胚胎体外发育,含有氨基酸的 G-HECM-1 组胚胎第一次卵裂率极显著地高于 TALP 组,与 CZB 和 HECM-1 两组无显著差异,说明氨基酸类(尤其是 1 mM 谷氨酰胺^[10,11])可以支持小鼠单细胞胚第一次卵裂。

2.2 EDTA 对小鼠单细胞胚胎体外发育的影响

在含有葡萄糖培养液里,EDTA 对小鼠早期胚胎体外发育有支持作用相继已有报导^[14,15]。本试验旨在观察在无葡萄糖条件下,EDTA 是否仍有此作用。用 m-CZB (除不含 EDTA 外,其它成份同 CZB) 和 CZB 液滴培养小鼠单细胞胚,发育结果见表 2。

由表 2 看出,培养液中 EDTA 的有或无,小鼠单细胞胚第一次卵裂没有显著的影响 ($P>0.05$),培养液中含 0.11 mM EDTA 的 CZB 组,克服 2 细胞胚胎发育的阻断率和桑椹期胚胎率都显著高于 m-CZB 组。

表 2 EDTA 对小鼠单细胞胚胎体外发育影响

组 别	入培数	第一次卵裂%	大于 2 细胞胚率%	桑椹胚率%
m-CZB	78	83.33 a	52.26 b	47.44 d
CZB	152	81.58 a	67.11 c	61.18 e

注:同一整栏相同字母标注者差异不显著 ($P>0.05$); c vs b、e vs d 差异显著 ($P<0.05$)。

2.3 小鼠血清对小鼠单细胞胚胎体外发育影响

本试验以 TALP 和 CZB 分别作为对照组,以 TALP 和 CZB 添加 10% 昆明小鼠血清为试验组,液滴培养小鼠单细胞胚,发育结果见表 3。

表3 10%小鼠血清对小鼠单细胞胚体外发育影响

组别	入培数	第一次卵裂率%	大于2细胞胚率%	桑椹胚率%
TALP	90	51.11 a	17.78 c	6.67 e
10%小鼠血清 +TALP	138	47.83 a	13.04 c	5.80 e
CZB	152	81.58 b	67.11 d	61.18 f
10%小鼠血清 +CZB	82	80.49 b	65.85 d	57.32 f

注：同一整栏内相同字母标注者差异不显著 ($P>0.05$)。

由表3可看出，添加10%小鼠血清2试验组，分别与各自对照组相比，小鼠单细胞胚胎体外发育的第一次卵裂率、克服2细胞阻断率和桑椹胚率都没有显著性差异 ($P>0.05$)，相反，添加血清组三项指标绝对值却低于对照组。

3 讨论

尽管葡萄糖是体细胞体外培养所必需的营养成份，已为人们所共识，但是它对早期胚胎体外培养影响的认识却经历较长的过程。早在1965年Brinster^[16]发现葡萄糖对随机交配的Swiss小鼠2细胞胚胎，有轻微毒害作用，但这结果并没有引起人们的充分注意，直到1988年，Schini等^[7]研究发现：葡萄糖（有磷酸盐存在条件下）引起金黄仓鼠胚胎出现2细胞阶段体外发育阻断。葡萄糖抑制作用也导致仓鼠胚胎8细胞阶段的阻断^[9]。用不含磷酸盐和葡萄糖的HECM-1培养仓鼠早期胚胎，不仅克服2细胞阶段发育阻断，而且移植后产生正常后代。葡萄糖抑制哺乳类动物早期胚胎发育已相继得证实（猪^[17]、牛^[18]、绵羊^[20]）。本试验用不含葡萄糖的培养液HECM-1、CZB培养昆明小鼠单细胞胚，发育至桑椹胚的比率分别为44.05%和61.18%，这与Chatot等^[10-11]对其它品系杂交小鼠报导一致，可见，葡萄糖对已研究过的哺乳类动物（小鼠、仓鼠、猪、牛、绵羊等）早期胚体外发育的抑制是一种普遍现象。

CZB液是Chatot、Ziomek和Bavister^[11]三人提出，简称CZB。它不含葡萄糖，含有0.11 mM EDTA和1.0 mM 谷氨酰胺。其它研究者^[10,11,13]分别用CZB培养其它品系随机交配小鼠胚胎，与本试验用昆明小鼠试验结果类似。早期胚胎可将葡萄糖合成糖原，这是一消耗大量能量的过程；早期胚胎卵裂需要有足够的能量方能进行。培养液中不含葡萄糖，防止因合成糖原而消耗能量现象发生，因此，早期胚胎可正常卵裂。谷氨酰胺是小鼠早期胚胎发育除丙酮酸和乳酸外，另一种重要能量物质，可补充前者代谢释放能量不足，含有谷氨酰胺培养液可显著提高小鼠单细胞胚发育至囊胚的比率^[11]。

在含有葡萄糖培养液中，适量EDTA可以螯合培养液中对胚胎发育有害的金属离子（如重金属离子），提高克服胚胎体外发育阻断比率^[14,15,19]。本试验证明，在不含葡萄糖的培养液中，EDTA对小鼠单细胞胚的体外发育，仍有较好的促进作用。

输卵管上皮细胞支持哺乳类动物早期胚胎体外发育，已有大量报道^[2,3,4,5,6]，人们倾向认为输卵管分泌某种（些）物质维持早期胚胎正常发育。本试验用10%小鼠血清分别添加到TALP和CZB液，发现小鼠血清在有或无葡萄糖的条件下，对小鼠单细胞胚体外发育都没有促进作用。如果说输卵管上皮细胞分泌某种（些）物质促进早期胚胎发育，那么这种

(些) 物质可能不是通过血液循环起作用的, 而是局部的通过输卵管直接作用于胚胎。

参 考 文 献

- 1 Bavister B D. Role of oviductal secretions in embryonic growth in vivo and in vitro. *Theriogenology*, 1988, 29: 143~153
- 2 Biggers J D, et al. Development of mouse embryos in organ culture of fallopian tubes on a chemically defined medium. *Nature*, 1962, 194: 747~749
- 3 Bavister B D, et al. Use of cultured mouse oviducts to by-pass in vitro development block in cleavage stage hamster embryos. (abstr.) *Biol Reprod*, 1988, 34: 191 (suppl.)
- 4 Eyestone W H, et al. Co-culture of early bovine embryos with oviductal epithelium. (abstr.) *Theriogenology*, 1987, 27: 228
- 5 Gandolfi F, et al. Stimulation of embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J Reprod Fert*, 1987, 81: 23~28
- 6 Whit K L, et al. Early embryonic development in vitro by co-culture with oviductal epithelial cells in pigs. *Biol Reprod*, 1989, 41: 425~430
- 7 Schini S A, et al. Tow cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose. *Biol Reprod*, 1988, 39: 1183~1192
- 8 Seshagiri P B, et al. Phosphate is required for inhibition by glucose of development of hamster 8-cell embryos in vitro. *Biol Reprod*, 1989, 40: 607~614
- 9 Seshagiri P B, et al. Glucose inhibits development of hamster 8-cell embryos in vitro. *Biol Reprod*, 1989, 40: 599~606
- 10 Chatot C L, et al. Development of 1-cell embryos from different strains of mice in CZB medium. *Biol Reprod*, 1990, 42: 432~440
- 11 Chatot C L, et al. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. *J Reprod Fert*, 1989, 86: 679~688
- 12 Bavister B D, et al. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. *Biol Reprod*, 1983, 28: 235~247
- 13 Poueymiroo W T, et al. Regulation of mouse preimplantation development; differential effects of CZB medium and Whitten's medium on rates and patterns of protein synthesis in 2-cell embryos. *Biol Reprod*, 1989, 41: 317~322
- 14 Mehta T S, et al. Development potential of mouse embryo conceived in vitro and cultured in Ethylenediamine tetraacetic Acid with or without amino acids or serum. *Biol Reprod*, 1990, 43: 600~606
- 15 Fissore R A, et al. Mouse zygote development in culture medium without protein in the presence of Ethylenediamine tetraacetic Acid. *Biol Reprod*, 1989, 41: 835~841
- 16 Brinster R L. Studies on the development of mouse embryos in vitro. II The effect of energy source. *J Exp Zool*, 1965, 158: 59~68
- 17 Misener M, et al. In vitro culture of porcine embryos in CZB medium. (abstr.) *Theriogenology*, 1991, 35: 244
- 18 Wang W L, et al. Effect of condition medium and glucose concentration on the in vitro development of early bovine embryos. (abstr.) *Theriogenology*, 1990, 33: 343
- 19 Gardiner C S, et al. Suppressed development of cultured mouse and swine embryos by Diethylstilbestrol. *J Anim Sci*, 1988, 66: 2401~2406
- 20 McGinnis L K, et al. In vitro development of ovine embryos in CZB medium. *Theriogenology*, 1992, 37: 559~569

STUDY ON CULTURING KUMING MOUSE 1-CELL EMBRYOS IN VITRO

Zhang Shouquan

(Dept of animal science)

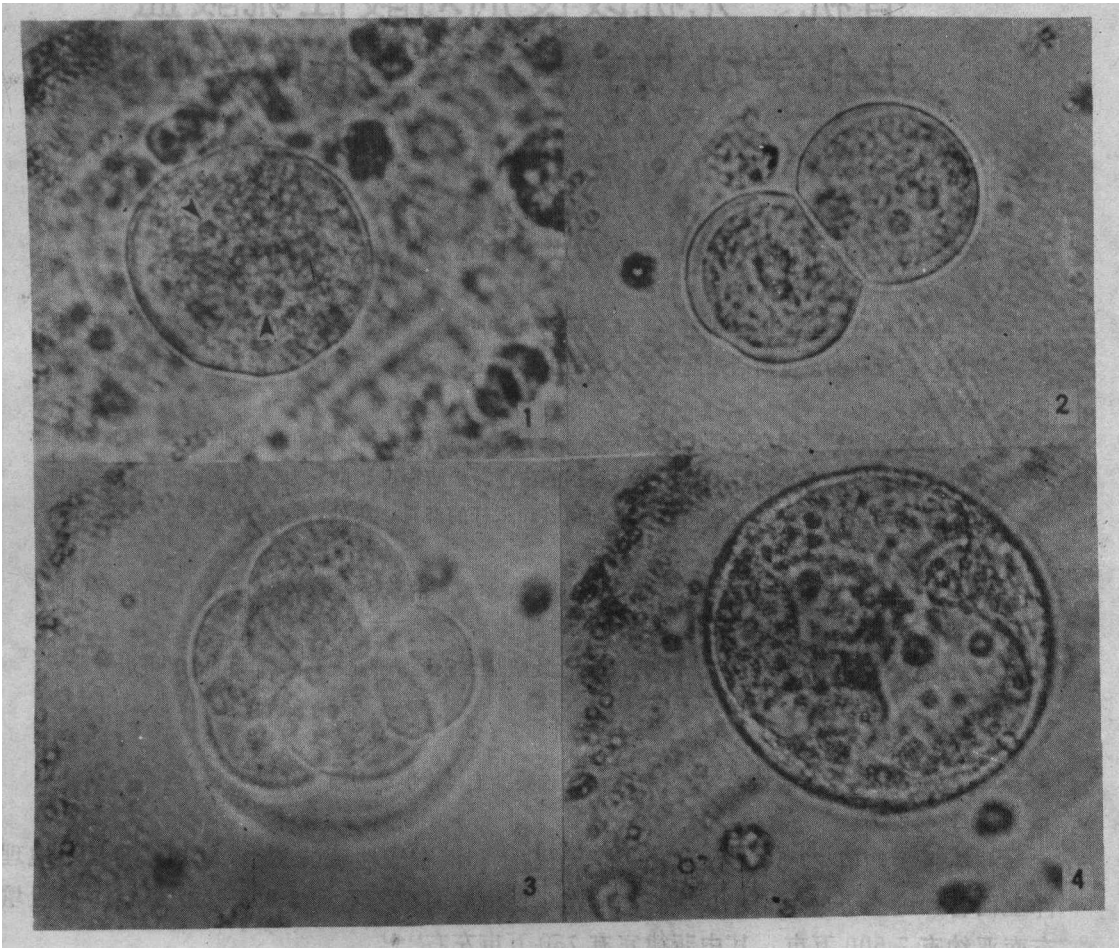
Sun Tuo

(Dept. of animal science

Beijing Agricultural University)

Abstract This study was dealt with the effects of glucose and mouse serum and EDTA on Kuming mouse 1-cell embryo development in vitro. The results show that the percentage of morula embryos cultured in glucose free HECM-1 is 40.05%, and the control only 8.14%; cultured in CZB containing 0.11mM EDTA is 61.18%, the control 47.44%. In conclusion, the presence of glucose in culture medium is detrimental to Kuming mouse 1-cell embryo development. EDTA supports mouse embryo development in vitro in glucose-free medium also. Glucose lacked or not, mouse serum doesn't affected in vitro mouse embryo development.

Key words Kuming mouse; 1-cell embryo; Glucose; EDTA; Mouse serum; Culture; In vitro



- 图版 1. 入培前的小鼠原核胚胎 (箭头指示两原核), 250×
2. 发育至 2-细胞期小鼠胚胎 400×
3. 发育至大于 8-细胞期小鼠胚胎 400×
4. 发育至囊胚期的小鼠胚胎 400×