

小鼠胚胎成纤维细胞与人胚共培养对胚胎体外发育影响

李 涛, 麦庆云, 周灿权, 庄广伦

(中山大学附属第一医院生殖中心, 广东 广州 510080)

摘 要:【目的】评价小鼠胚胎成纤维细胞共培养是否促进 d 3 质量差的人胚胎的囊胚发育。【方法】使用小鼠胚胎成纤维细胞与受精后第 3 天(d 3)质量差的胚胎共培养, 对照组使用 Quins 囊胚培养液进行序贯培养, 观察各阶段囊胚形成率, 检测囊胚总细胞数。【结果】d 5 共培养组 12.3% 胚胎开始出现早期囊腔化, d 6 7.4% 胚胎出现囊腔扩张, 4.2% 的胚胎 d 7 孵出。而序贯培养组 d 5 仅 4.2% 胚胎开始早期囊腔化, d 6 仅 1.5% 胚胎出现囊腔扩张, d 7 仅 0.6% 的胚胎孵出, 表明共培养组囊胚形成率更高, 囊胚发育速度快于对照组。此外, 共培养组囊胚总细胞数更多, d 6 扩张囊胚总细胞数为 62.6 ± 13.4 , 而未扩张囊胚总细胞数 26.1 ± 8.9 , 分别高于序贯培养组。【结论】小鼠胚胎成纤维细胞共培养与 Quins 囊胚培养液序贯培养比较, 前者更能促进 d 3 质量差的人胚胎体外发育。

关键词: 培养; 胚胎; 胚胎

中图分类号: R321-33

文献标识码: A

文章编号: 1000-257X(2003)01-019-04

The Effects of Coculture of Mouse Embryonic Fibroblast Cells with Human Embryos on Embryo Development *in vitro*

LI Tao, MAI Qing-yun, ZHOU Chan-quan, ZHUANG Guang-lun

(Reproductive Center, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 to evaluate the effects of coculture with mouse embryonic fibroblast cells on day 3 poor quality human embryos. 【Methods】 Half of the embryos were cocultured with mouse embryonic fibroblast cells (MEF) in the experiment group, while the others were cultured in Quins sequential medium in the control group. Blastulation rate was observed and total cell number (TCN) of blastocysts was detected. 【Results】 12.3% embryos began to form early cavities in the coculture group on day 5, and 7.4% of the embryos were expanding on day 6 with 4.2% hatched on d 7, while in the sequential group only 4.2% reached the early cavity stage on day 5 and 1.5% were expanding on day 6, 1.5% hatched on day 7. It showed that the blastocyst development rate of the coculture group was higher than that of the sequential culture group, and embryos developed more quickly in the coculture group. In addition, blastocysts had more TCN when cocultured with MEF. The TCN of the expanding blastocysts of day 6 was 62.6 ± 13.4 , while in the non-expanding group on day 6 it was 26.1 ± 8.9 . Both of them were higher than that of embryos in the sequential culture group. 【Conclusion】 The effects of coculture with mouse embryonic fibroblast cells on *in vitro* development of day 3 poor quality human embryos are superior to that of culture in Quins sequential media.

Key words: culture; blastocyst; embryo

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2003,24(1):19~22]

胚胎体外培养中使用共培养由来已久, 先后使用过多种辅助细胞与胚胎共培养, 如人及牛输卵

管上皮细胞、Vero 细胞、颗粒细胞等。但是, 人们对共培养的益处尚无一致意见。一些共培养系统

收稿日期: 2002-07-24

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(083017)

作者简介: 李 涛(1971-), 女, 四川仁寿人, 博士生; 周灿权, 主任, 教授, 项目负责人。

报道有较高的囊胚形成率^[1],可高达55%~69%,而采用Vero细胞与人胚胎共培养时,Bongso等^[2]报道其囊胚形成率与序贯培养基无差异;Wetzels等^[3]报道人成纤维细胞不促进人胚胎发育。本研究使用小鼠成纤维细胞与常规体外受精-胚胎移植(*in vitro* fertilization and embryo transfer, IVF-ET)中受精后第3天(d 3,下同)废弃胚胎共培养,观察囊胚发育情况。这些胚胎总体质量差,囊胚形成率低,但是,它们对培养系统的依赖性更强,可敏感地反映体外培养系统的差异。

1 材料和方法

1.1 胚胎收集与分组

本中心常规移植和冷冻d 3质量好的胚胎,即d 3为4个细胞以上,I~II级的胚胎,废弃质量差的胚胎[细胞数<4,或(和)III~IV级胚胎],我们选择2001年9月至2002年5月,细胞数>4的废弃胚胎进入本实验(d 3细胞数<4的胚胎发育潜力极低),将这些胚胎随机分为两组,一组与小鼠成纤维细胞共培养,另组置于Quins囊胚培养液(含50 mL/L人血清白蛋白)培养。

1.2 胚胎体外培养方案

1.2.1 共培养 取卵日解冻第3代12.5 d小鼠胚胎成纤维细胞,接种于35 mm培养皿。移植前1 d用丝裂霉素C(10 mg/L)处理2.5 h,抑制小鼠成纤维细胞有丝分裂,胰酶消化成单个细胞,重新接种制成50 μ L/滴的小鼠成纤维细胞液滴,培养液为低糖(dulbecco's modified medium, DMEM),次日换为Quins囊胚培养液。随机将每日收集的每个病人d 3废胚胎的一半置于小鼠成纤维细胞液滴中共培养,10~15胚胎/滴,隔日换液。

1.2.2 序贯培养 本中心常规采用Quins卵裂期胚胎培养液培养d 3之前的胚胎,实验中继续使用Quins囊胚培养液培养d 3收集的另一组废弃胚

胎,微滴法成组培养,50 μ L/滴,每滴10~15个胚胎。

1.3 胚胎的观察

每日上午10时观察d 5,d 6,d 7囊胚发育情况,囊胚内细胞团(inner cell mass, ICM)形态。记录各阶段囊腔发育:早期囊腔——出现囊胚腔,囊腔小于胚胎体积的1/2;完全囊腔:囊腔充满整个胚胎;扩张期囊腔——囊腔扩张,直径大于最初的胚胎直径,透明带变薄;正孵出的囊胚:滋养层正从透明带中孵出;已孵出的囊胚:囊胚完全从透明带中孵出。

1.4 检测囊胚总细胞数

每日同一时间检测d 6,d 7所有囊胚的总细胞数(TCN)。囊胚置于5 g/L柠檬酸钠液中,37 $^{\circ}$ C孵育15~30 min,转移到干净玻片上,吸去大部分柠檬酸钠溶液,在囊胚上垂直滴几滴固定液(冰乙酸:乙醇,1:3),待玻片风干后吉姆萨液染色,计数囊胚的总细胞数目。

2 结果

本中心常规移植和冷冻d 3质量好的胚胎^[4,5],即I~II级、4细胞以上的胚胎,废弃d 3质量差的胚胎,包括细胞数<4,和(或)III~IV胚胎,这些胚胎发育潜力较低。实验发现这些胚胎总的发育速度较慢,大部分d 5才开始囊腔形成,d 6~7开始扩张,d 7开始孵出。实验中共收集296个病人的1 014个废弃胚胎(2001年9月至2002年5月),共培养组共有胚胎509个,对照组505个。从表1可看出,共培养系统中d 6总的囊胚形成率为24.3%,序贯培养为9.9%,d 7共培养组(包括d 6的总的囊胚形成率)为29.1%,序贯培养组为12.9%,共培养组囊胚发育率明显高于序贯培养组,两组间存在统计学差异。

此外,d 5共培养组12.3%胚胎开始早期囊腔

表1 两种培养系统中的d 3胚胎的发育

Table 1 The development of d 3 embryos in two culture systems (%)

	d 5 blastocyst					d 6 blastocyst					d 7 blastocyst				
	E	F	Ex	H	T	E	F	Ex	H	T	E	F	Ex	H	T
Sequential culture	4.2 ¹⁾	0	0	0	4.2 ¹⁾	5.6 ¹⁾	2.8 ¹⁾	1.5	0	9.9 ¹⁾	7.4	3.1 ¹⁾	1.8 ¹⁾	0.6 ¹⁾	12.9 ¹⁾
Coculture	12.3	5.5	0	0	17.8	14.7	11.1	7.4	1.8	24.3	5.0	13.6	8.3	4.2	29.1

E=early-cavity; F=fully-cavity; Ex=Expanded; H=hatched; T=total. Statistical significant between two groups 1) $P < 0.05$

表2 两种培养系统囊胚细胞数量比较
Table 2 Total cell number of blastocysts in two culture systems ($\bar{x} \pm s$)

	d 6 blastocysts		d 7 blastocysts	
	Expanded(include hatched)	Non-expanded	Expanded(include hatched)	Non-expanded
Sequential culture	47.2±9.5 ¹⁾	19.3±5.1 ¹⁾	86±12.4	30.8±8.2 ¹⁾
Coculture	62.6±13.4	26.1±8.9	95.3±16.8	53.1±6.6

Note: Statistical significant between two groups 1) $P < 0.05$

化,5.5%胚胎完全囊腔化,d 6 7.4%胚胎出现囊腔扩张,d 7 4.2%的胚胎孵出。而序贯培养组 d 5 仅 4.2%胚胎开始早期囊腔化,d 6 仅 1.5%胚胎出现囊腔扩张,d 7 仅 0.6%的胚胎孵出,表明 d 3 质量差的胚胎在共培养系统中发育速度快于序贯培养,d 5 共培养组有更多的胚胎开始形成囊胚,d 6 有更多的囊胚开始扩张,d 7 有更多的囊胚孵出,也表明序贯培养组有更多的囊胚发育缓慢及停滞。

从表 2 可看出,d 6 共培养组扩张囊胚(包括已孵出者)的细胞数明显大于序贯培养组($P < 0.05$),未扩张的 TCN 也大于序贯培养组($P < 0.05$)。d 7 共培养组扩张囊胚(包括已孵出者)TCN 略大于序贯组,二者无统计学差异($P > 0.05$),未扩张囊胚 TCN 仍明显高于序贯培养组($P < 0.05$),此外,从 d 5 到 d 7,TCN 逐渐增加。从形态上看,序贯培养组囊胚质量较差,ICM 细胞数目少,出现黑点。

本实验的共培养系统使用小鼠成纤维细胞作为辅助细胞,它呈三角形或多角形,单层贴壁生长,共培养得到的囊胚如图 1A,1B,囊胚吉姆萨液染色见图 2。

3 讨论

影响囊胚形成的因素很多,如取卵数、d 3 胚胎数、体外培养系统、母亲年龄、男方不孕因素等,其中重要的一环是体外培养系统。早期使用单一简单培养液,人囊胚形成率很低。随后出现动物及人的成体细胞与人胚胎共培养,使用中人们发现较多的细胞类型可促进胚胎体外发育,其中一些共培养系统有较高的囊胚形成率,可高达 55%~69%。如 Fabbri 等^[6]报道人胚胎与病人自身的颗粒细胞共培养可促进胚胎发育,50%的胚胎 d 5/6 可到达囊胚阶段。Simon 等^[7]报道共培养可促进反复种植失败病人的胚胎种植率。另一方面,随着对早期

人胚生理及代谢需求的进一步了解,一些研究者合成了复杂的序贯培养液,如 G1.1、G2.2; P1、P2; S1、S2; Quins 卵裂期培养液和囊胚培养液等,这些序贯培养液富含氨基酸等营养成分,并根据胚胎所处的不同环境及代谢需求调整了葡萄糖、丙酮酸、氨基酸等的含量,使用后报道的囊胚形成率明显增高^[8~10],一些作者报道序贯培养与共培养之间囊胚形成率无明显差异,如 Bongso 以及 Wetzels 等分别采用 Vero 细胞、人成纤维细胞与人胚胎共培养,他们报道,与序贯培养相比,共培养无任何益处。但是,这些研究均采用 d 3 质量好的胚胎体外序贯培养,这些胚胎总体发育潜力高,可能不能反映体外培养系统的差异。

本实验采用 d 3 质量差的废弃胚胎与小鼠成纤维细胞共培养,这些胚胎总体质量差,总的发育潜力低,对培养系统的依赖性更强,可能比 d 3 质量好的胚胎更能反映培养系统的差异。实验中将每个病人 d 3 废弃胚胎随机分两组,自身对照,排除取卵数、不孕因素、母方年龄等对囊胚形成率的影响,主要观察不同培养系统的差异,即共培养与序贯培养,结果发现共培养的胚胎囊胚形成率明显高于序贯培养,各阶段囊胚发育率更高,更多的囊胚扩张,更多的囊胚孵出。囊胚发育速度更快,囊胚总细胞数更多,囊胚总细胞数是反映囊胚发育潜力最敏感的指标之一,因此共培养获得的囊胚发育潜力更高。

胚胎与辅助细胞共培养系统由来已久,最初用于动物实验中以防止胚胎发育阻滞。随着辅助生育技术的发展,一些研究者将胚胎与体细胞的共培养引入试管婴儿临床工作中,以弥补体外培养系统的不足,使用中人们发现较多的细胞类型可促进人胚胎的体外发育,但是其具体机制目前尚不十分清楚,Barmat 等^[11,12]报道人输卵管上皮细胞可分泌一些胚胎营养因子,如集落刺激因子-1、白血病抑制因子(LIF)、白介素 2(IL-2)等促进胚胎发育,其

他研究者还发现胚胎表面存在这些生长因子及细胞因子受体,进一步表明这些胚胎营养因子的作用。另一些作者^[13]报道共培养的辅助细胞可抑制胚胎凋亡、吸收分解培养系统中的有毒物质等,弥补体外培养系统的不足。本实验中共培养的胚胎囊胚形成率高于序贯培养,囊胚发育速度更快,囊胚总细胞数更多,这表明共培养系统仍然优于目前的序贯培养系统。

共培养存在一定的局限性,如需要制作辅助细胞,这将增加日常工作量;存在将未知病毒传染给胎儿及母亲的风险(一些生殖中心使用已经检测的细胞系进行共培养可能可以解决此问题),目前尚不能广泛应用于临床。但是,通过胚胎与体细胞共培养,我们可以研究胚胎的体外发育以及进一步研究共培养促进胚胎体外发育的具体机制,并根据此机理改善目前的序贯培养系统,提高人胚胎体外培养效率。

(本文图 1,2 见插页 3. Fig. 1,2 shown in back coloured page 3)

参考文献:

- [1] Wiemer K E, Hoffman D I, Maxson W S, *et al.* Embryonic morphology and rate of implantation of human embryos following co-culture on bovine oviductal epithelial cells[J]. *Hum Reprod*, 1993, 8(1): 97.
- [2] Fong C Y, Bongso A. Comparison of human blastulation rates and total cell number in sequential culture media with and without co-culture[J]. *Hum Reprod*, 1999, 14(3): 774.
- [3] Wetzels A M, Bastiaans B A, Hendriks J C, *et al.* The effects of co-culture with human fibroblasts on human embryo development in vitro and implantation[J]. *Hum Reprod*, 1998, 13(5): 1325.
- [4] 钟依平,周灿权,庄广伦,等. 血清孕酮水平对体外受精-胚胎移植结局的影响[J]. *中山医科大学学报*, 2002, 23(2): 124.
- [5] 方 丛,庄广伦,徐艳文,等. 罗氏易位携带者胚胎植入前遗传学诊断的研究[J]. *中山医科大学学报*, 2001, 22(3): 202.
- [6] Fabbri R, Porcu E, Marsella T, *et al.* Human embryo development and pregnancies in an homologous granulosa cell coculture system[J]. *J-Assist-Reprod-Genet*, 2000, 17(1): 1-12.
- [7] Simon C, Mercader A, Garcia-Velasco J, *et al.* Coculture of human embryos with autologous human endometrial epithelial cells in patients with implantation failure [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999, 84(8): 2638.
- [8] Gardner D K, Schoolcraft W B, Wagley L, *et al.* A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization[J]. *Hum Reprod*, 1998 13(12): 3434.
- [9] Langley M T, Marek D M, Gardner D K, *et al.* Extended embryo culture in human assisted reproduction treatments[J]. *Hum Reprod*, 2001, 16(5): 902.
- [10] 庄广伦. 体外受精与胚胎移植研究进展[J]. *中山医科大学学报*, 1997, 18(1): 1.
- [11] Barnat L I, Worrirow K C, Paynton B V. Growth factor expression by human oviduct and buffalo rat liver coculture cells[J]. *Fertil Steril*, 1997, 67(4): 775.
- [12] Barnat L I, Liu H C, Spandorfer S D, *et al.* Human preembryo development on autologous endometrial coculture versus conventional medium [J]. *Fertil Steril*, 1998, 70(6): 1109.
- [13] Xu J, Cheung T M, Chan S T, *et al.* Human oviductal cells reduce the incidence of apoptosis in cocultured mouse embryos[J]. *Fertil Steril*, 2000, 74(6): 1215.

(编辑 张恩健)

我校医学科研首次获得“十五”国家重大科技攻关专项

在国家“973”计划、国家自然科学基金重大与重点项目,以及“863”计划项目的资助下,我校附属肿瘤防治中心曾益新教授带领的课题组与人类基因组南方中心黄薇的课题组密切合作,并与国外知名大学合作,共同攻关,经过长期努力,终于在鼻咽癌易感基因研究方面取得了重大突破,成功地把鼻咽癌易感基因定位在 4 号染色体的 4p15.1-q12 区域,为鼻咽癌易感基因的克隆打下了坚实的基础,具有巨大的学术价值与社会价值。在此基础上,曾益新教授进一步获得“十五”国家重大科技攻关专项的资助,课题名称为“鼻咽癌相关基因的研究”,资助经费 1000 万元,省、市配套 1000 万元。这是我校医科首次获得的以我校作为主持单位、以我校专家作为首席科学家的国家重大科技攻关项目。

(医学科学处计划科)

小鼠胚胎成纤维细胞与人胚共培养对胚胎体外发育影响 (正文见第 19 页)

The Effects of Coculture of Mouse Embryonic Fibroblast Cells with Haman Embryos on Embryo Development *in vitro* (Text in page 19)



图 1 共培养获得的囊胚

图 2 囊胚细胞吉姆萨染色

Fig. 1 Blastocyst developed in coculture system

A: expanded blastocyst; B: hatched blastocyst (200 ×)

Fig. 2 Cells of blastocyst stained by giemsa (100 ×)

高血压大鼠心肌中 MMP-2 的蛋白表达及其 RAS 阻断后的变化 (正文见第 30 页)

Protein Expression of Matrix Metalloproteinase - 2 in Heart of Hypertensive Rats, and Its Changes After Blackage of RAS (Text in page 30)

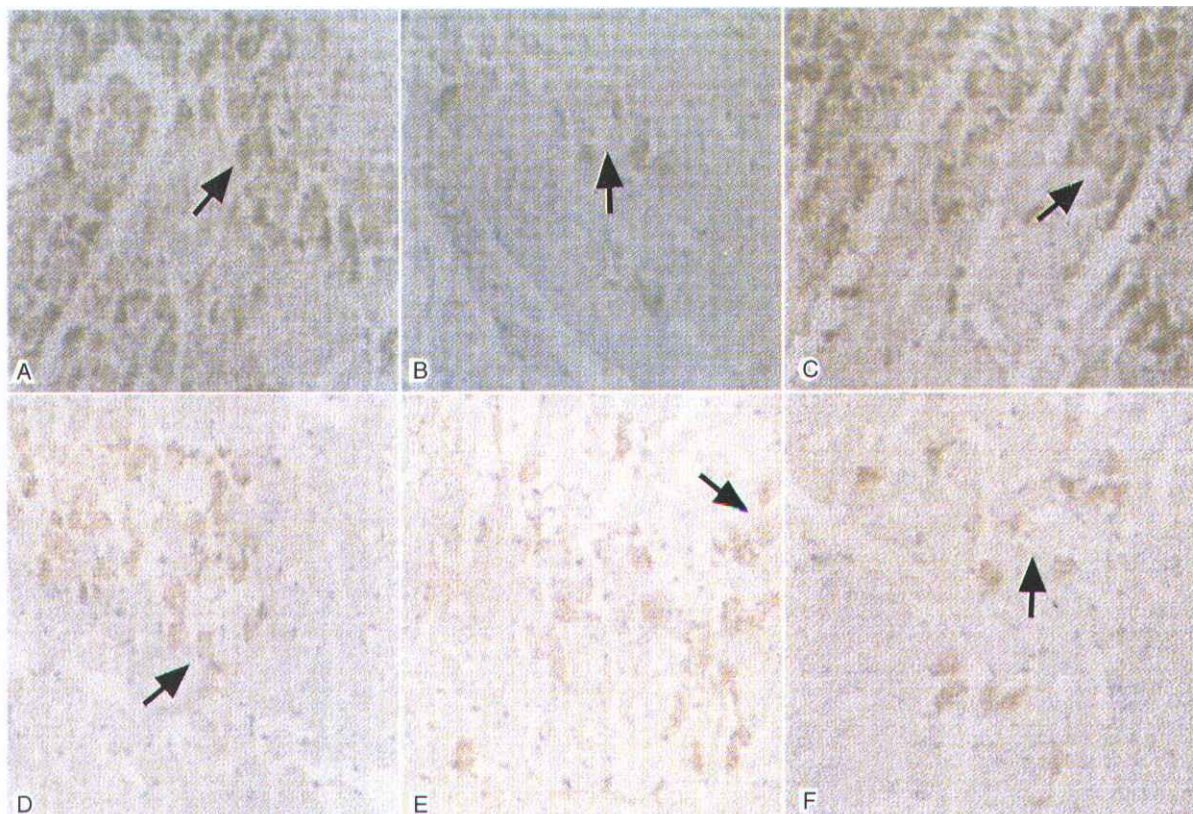


图 1 免疫组化染色测定大鼠左室心肌中 MMP-2 的蛋白表达(染色呈棕黄色)

Fig. 1 MMP-2 protein expression (brown stained) in left ventricular myocardium of rats was detected by immunohistochemical staining

A: SHRSP control group (10 × 20) B: WKY control group (10 × 20)

C: Placebo treated group (10 × 20) D: Valsartan treated group (10 × 20)

E: Benazepril treated group (10 × 20) F: Combination treated group (10 × 20)