

·经验交流·

不同培养液对小鼠胚胎体外发育的影响

李智 俞生 黄冰 陈系古

(中山医科大学动物中心; 广州, 510089)

主题词 小鼠/胚胎学; 培养基

中图分类号 R 321

在转基因小鼠构建过程中,其受精卵常常会在早期体外培养时出现原因不明的发育停滞或发育阻断(Block to Development),导致胚胎体外发育的失败。为了解决这一问题,国内外研究人员对胚胎培养基成分进行调整,加入多种氨基酸以满足胚胎营养需求,或去除葡萄糖和重金属离子以保护早期胚胎不受伤害。近来,又将胚胎与卵丘细胞或同种/异种输卵管上皮细胞共同培养,使胚胎体外发育的环境与体内自然环境相似。目前普遍认为葡萄糖抑制桑椹胚前的卵裂,但又是囊胚期所必需的。为了使胚胎在体外发育达到较好的效果,我们利用同种输卵管上皮细胞(Oviduct Epithelium Cell, OEC)与胚胎进行共同培养,并通过改变培养液中葡萄糖含量以满足胚胎发育不同时期的要求。本实验研究葡萄糖、OEC 共培养对胚胎体外发育的影响作用,以解决胚胎在不同发育时期对葡萄糖及其它因素不同需求的矛盾。现将结果报道如下。

1 材料方法

1.1 动物准备

昆明小鼠,鼠龄>8周,体重25~35g,雌雄分笼饲养(由中山医科大学动物中心提供)。

1.2 培养液及培养条件

M 16培养液,参考高等教育出版社《现代分子生物学实验技术》的M 16配方^[1],葡萄糖含量为1%(主要试剂由Sigma公司提供)。Glu-Free M 16(无葡萄糖M 16),即将M 16中的葡萄糖除去,其它同M 16。M 16+OEC 培养液, M 16 培养微滴

中加入小块 OEC 共同培养。Glu-Free M 16 + OEC, 在 Glu-Free M 16 培养微滴中加入小块 OEC 共同培养。高压灭菌石蜡油。Heraeus 型培养箱,温度为 37 °C, CO₂ 浓度为 5%, 湿度为 100%。

1.3 实验步骤

1.3.1 雌鼠超排准备 取雌鼠若干只,于下午 4:00 腹腔注射孕马血清(PMSG) 7 U/只,48 h 后注射绒毛膜促性腺激素(HCG) 10 U/只。注射后即与雄鼠合笼过夜。第 2 天早晨 8:00 检查雌鼠阴道栓,将栓阳性者隔离,准备取卵。

1.3.2 取卵 在栓检后 6~8 h 颈椎脱臼处死小鼠,打开腹腔取出输卵管,将其壶腹部撕开,即可见受精卵同周围卵丘细胞涌出输卵管。用 1 毫升 150 单位的透明质酸酶去除卵丘细胞,在 M 16 培养液中尽量清除卵丘细胞。

1.3.3 培养及观察 取直径 35 mm 的 1 次性培养皿,分别滴加上述 4 种培养液和 OEC,成 0.05~0.1 mL 的小滴,用灭菌石蜡油封盖液滴,然后将清洗过的胚胎按 20~25/滴放入培养滴中。置入培养箱中培养,12~24 h 换液并观察记录胚胎发育数。

1.4 统计学分析

应用 χ^2 检验进行数据分析。

2 结 果

在培养 72 h 后,对培养液变化的 4 组胚胎进行统计,见表 1。

表1 培养液的变化对胚胎发育的影响

Table 1 Effect of different medium on development of mouse embryos *in vitro*

Groups	Number of Embryos	Pass the first cleavage(2-cell)	Pass the 2nd cleavage(4-cell)	8-16 cells phase	Morula or blastocysts
1. M 16	129	105(81.39%)	53(41.09%) ¹⁾	42(32.56%) ³⁾	35(27.1%) ³⁾
2. Glu-Free M 16	83	69(83.13%)	46(55.42%) ²⁾	10(12.05%) ⁴⁾	6(7.23%) ⁴⁾
3. M 16+OEC	145	124(85.52%)	91(62.75%) ²⁾	69(47.59%) ⁵⁾	58(40.0%) ⁵⁾
4. Glu-Free M 16+OEC	61	51(83.61%)	39(63.93%) ²⁾	8(13.11%) ⁶⁾	3(4.92%) ⁶⁾

1) vs 2), $\chi^2=15.59$, $P<0.01$; 3) vs 4), $\chi^2=11.74$, $P<0.01$; 5) vs 6), $\chi^2=21.79$, $P<0.01$

3 讨论

3.1 葡萄糖的早期发育阻断作用

胚胎体外培养过程中,小鼠的受精卵常常停滞在双细胞期而不再向前发展,但此时胚胎并未退化死亡,往往是在发育停滞48~72 h后出现细胞的退化溶解。这即所谓“2细胞阻断”。1988年, Schimi等^[2]发现葡萄糖在磷酸盐存在的条件下造成金黄仓鼠胚胎的2细胞阻断。随后 Chatot等^[3]也发现葡萄糖对CF1、DBA/2J小鼠有2细胞阻断作用。我们的实验与上述研究结果一致,在第2次卵裂时,葡萄糖培养液中有近60%的胚胎不能通过,而对照的无糖培养液只有40%,两者间存在着显著差异,说明葡萄糖对昆明小鼠也同样具有2细胞发育阻断作用。因而认为葡萄糖是导致胚胎2细胞阻断的重要因素。已有研究表明^[4]:在鼠的早期胚胎中缺乏己糖分解酶系统,因而在早期胚胎主要的能量物质不是葡萄糖而是丙酮酸,通过三羧酸循环将丙酮酸转化为谷氨酸、丙氨酸、天冬氨酸等提供胚胎发育所需要的能量。而只有到桑椹胚以后,葡萄糖才作为主要的能量来源被分解利用^[5]。这同从体内收集到的不同阶段的早期胚胎具有较低且恒定的糖原含量的现象是一致的^[6]。因此,认为早期大量的葡萄糖进入胚细胞后,将被转化为糖原贮存。由于大量糖原的合成过程消耗掉大部分能量,从而抑制了早期胚胎的正常卵裂,出现发育阻断。以后由于糖原水化使细胞膨胀,最终导致胚胎破裂溶解。

3.2 OEC共培养的阻断抑制作用及葡萄糖的晚期作用

含糖培养液中有OEC共同培养时,胚胎通过2细胞阻滞的比率与无糖培养液中的相近,两者间无

明显差异。说明在胚胎发育的早期OEC能够抑制葡萄糖对细胞的阻断作用。这可能与OEC能够分泌某些促进胚胎发育的物质,使之克服了体外发育阻断的现象有关,或者由于OEC的共同培养能够清除环境中对胚胎发育不利的物质,使胚胎发育的条件得到改善从而突破阻滞^[7]。

当胚胎发育至8~16细胞及以后阶段时,含糖和无糖培养液之间出现了明显差异,这说明随着胚胎发育进程的不断深入,胚胎的结构与功能逐步完善,此时只依靠丙酮酸作为能量来源远远不能满足胚胎发育的需要,必需利用葡萄糖作为主要的能量来源。如果此时培养液中缺乏葡萄糖而只有丙酮酸和OEC所提供的少量能量和营养物质,是不足以支持胚胎继续发育的。因此认为,做为胚胎滋养层的形成和囊胚孵化的主要能量来源的高浓度葡萄糖^[8],在胚胎体外发育到8~16细胞期及以后的阶段是非常重要的^[5,8]。因此有必要在胚胎发育的不同阶段使用不同的培养液。

另外,胚胎一旦通过了2细胞期停滞,都能以较高的发育率向后期阶段发育,OEC的存在与否并不重要。进一步证明了胚胎在第2次卵裂后葡萄糖即不再成为阻滞胚胎发育的因素,反而更有利于其向前发展。而此时OEC对胚胎的作用逐渐减弱,不如早期那样重要。

根据以上的结果分析,葡萄糖、输卵管上皮细胞都能够影响小鼠受精卵的体外发育。特别是葡萄糖,作为培养液的成分之一,却在胚胎发育的不同时期起着不同的作用。因此,在小鼠胚胎体外培养时,可以根据胚胎发育的不同阶段及时改变不同的培养液成分,即在早期,特别是在2细胞期前给予不含糖的培养液,同时使用OEC进行共同培养;在胚胎突破2细胞阻断后即给予含糖培养液,藉此提高小鼠胚胎体外发育的效率。

参 考 文 献

- 1 卢圣栋主编. 现代分子生物学实验技术. 北京: 高等教育出版社, 1993. 534
- 2 Schini S A, Bavister B D. Two-cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose. *Biol Reprod*, 1988, 39(6): 1183
- 3 Chatot C L, Lewis J L, Torres I, *et al*. Development of 1-cell embryos from different strains of mice in CZB medium. *Biol Reprod*, 1990, 42: 432
- 4 Brinst R L. Studies on the development of mouse embryos in vitro II. The effect of energy source. *J Exp Cell Res*, 1969, 158: 59
- 5 Rossant J, Pedersen R A. Experimental approach to

mammalian embryonic development. Cambridge, Cambridge University Press, 1986. 267

- 6 Ozias C B, Stern S. Glycogen levels of preimplantation mouse embryos development *in vitro*. *Biol Reprod*, 1973, 8(7): 467
- 7 White K L, Hehnke K, Rickords L F, *et al*. Early embryonic development *in vitro* by coculture with oviductal epithelial cell in pigs. *Biol Reprod*, 1989, 41(9): 425
- 8 Nasr-Esfahani M H, Winston N J, Johnson M H, *et al*. Effects of glucose, glutamine, ethylenediaminetetraacetic acid and oxygen tension on the concentration of reactive oxygen species and on development of the mouse preimplantation embryo in vitro. *J Reprod Fertil*, 1992, 96: 219

(1997-12-03 收稿 1998-04-13 修回)

(上接第 233 页)

深、操作不便, 容易损伤阴部内血管及神经。至于创伤后早期行后尿道吻合术, 有一组报告阳痿发生率为 2/24^[1], 疗效满意。但此术式有其不易被多数人接受的一面: 采用截石位进行手术对骨盆骨折有引起骨折再移位、加重损伤的可能, 同时因骨盆骨折所引起的盆腔静脉丛撕裂和骨折面渗血, 加上术中出血, 往往出血量大, 而且术野深、操作时间长, 故只能在伤情允许、骨盆环稳定及技术条件成熟的情况下进行。

本组 35 例尿道会师牵引术后发生尿道狭窄 3 例(8.6%), 需再次手术 1 例(2.9%), 远较 Gibson 报告的发生狭窄 41% (18/44)^[8] 及鲁功成的 51.6 (16/31)^[9] 为低。我们认为, 采用这种术式的许多细节与治疗效果有密切关系, 除了要注意血肿的有效引流, 导尿管大小、质地的选择、术后抗感染等环节, 我们的改进措施是: ①使用尿道会师引导探条。尿道会师多年来一直沿用的方法是采用 2 条金属尿道探条或将手指伸入前列腺作引导, 也有的作者介绍“二镜腔内会师术”^[10], 这些方法盲目性及创伤性仍较大。我们将膀胱内的会师探条改为尖端带孔的空心探条以后, 2 探条在断端中极易对合, 可大大减少盲目操作及医源性损伤。②留置 Foley 导尿管将尿道断端拉拢, 传统的方法是利用床尾滑轮挂盐水瓶进行牵拉。由于盐水瓶重量的惯性作用, 病人在床上翻身等活动时, 经测定拉力可出现大约 ±200 g 的变化。改进后的牵引装置除可以直接指示拉力大小、调整拉力方便以外, 由于橡皮条的缓冲作用, 不再出现拉力的忽松忽紧变化, 使愈合面处于一种相对稳定的状态, 有利于愈合。③尿

管拔除后应注意善后治疗, 坚持定期尿道扩张, 防止狭窄。多数病人扩张 2~4 次即可。本组 1 例手术失败者, 除了与伤重有关之外, 患者出院后半年内一直未按嘱作定期尿道扩张是个重要原因。

参 考 文 献

- 1 吴国荃, 高居忠, 杜林栋, 等. 外伤性后尿道断裂早期端端吻合术. *中华泌尿外科杂志*, 1992, 13: 283
- 2 Morehouse D D. Emergency management of urethral trauma. *Urol Clin North Am*, 1982, 9: 251
- 3 曾祥福, 李炎唐. 骨盆骨折合并尿道损伤的处理. *中华泌尿外科杂志*, 1991, 12: 444
- 4 Patterson D E, Barrepp B M, Myers R P, *et al*. Primary realignment of Posterior urethral injuries. *J Urol*, 1983, 129: 5136
- 5 Turner-Warwick R. Observation on the treatment of traumatic urethral injuries and the value of the fenestrated urethral catheter. *Br J Surg*, 1973, 60: 775
- 6 Dhabuwala C B, Hamid S, Katsikas D M, *et al*. Impotence following delayed repair of prostatic urethral. *J Urol*, 1990, 144: 667
- 7 王道仁, 彭斌平, 熊礼生, 等. 后尿道损伤的处理与性功能. *中华泌尿外科杂志*, 1989, 10: 349
- 8 Gibson G R. Urological management and complications of fractured pelvis and ruptured urethra. *J Urol*, 1974, 111: 353
- 9 鲁功成, 熊旭林, 曾甫清, 等. 后尿道断裂早期手术处理. *中华泌尿外科杂志*, 1991, 12: 130
- 10 汪成保, 徐延国, 杜宏旺, 等. 二镜腔内尿道会师术 20 例报告. *中华泌尿外科杂志*, 1993, 14: 366

(1998-02-03 收稿 1998-04-08 修回)