

哺乳动物早期胚胎体外培养的研究

1. 2-细胞期小鼠胚胎的发育

陈秀兰 孟春玲

(中国科学院遗传研究所,北京)

体外培养哺乳动物卵细胞技术是实验胚胎学和发育遗传学研究的重要手段。实验哺乳动物如小鼠、仓鼠、大鼠和兔等卵细胞的体外培养已有许多报道^[1,3,4,6-11],尤其是小鼠卵细胞的培养工作更多,可以说已是常规化了。但是我国这方面的研究还较少,就连体外培养的早期受精卵,也往往不能发育。

本试验全部采用国产药品,以 Whitten^[10]氏液为基本溶液,比较了5种培养液成分对小鼠早期胚胎发育的影响,为探求比较简便的培养方法,为实验胚胎学或发育遗传学等方面的研究提供实验手段和依据。

材料和方法

(一) 2-细胞期小鼠胚胎的获得

用随机交配系性成熟的昆明小白鼠,每只雌鼠腹腔注射5—10单位的孕马血清(卫生部长春生物制品研究所生产)进行超数排卵处理,一般约在16:00—17:00的时间内注射。48小时后腹腔注射5单位绒毛膜激素(北京东风制药厂生产),并将雌鼠与雄鼠以2:1的比例放在一起。第二天上午8:00检查雌鼠,把有阴道栓的雌鼠排出。在绒毛膜激素注射后的45小时左右杀死有阴道栓的雌鼠,从其输卵管冲出胚胎。这时胚胎处于2-细胞阶段,也有未受精卵或处于3—4细胞期阶段的胚胎。

(二) 培养液

以 Whitten (1971) 氏液为基本培养液,改变或添加一些其他成份,配成5种培养液(见表1)。培养液需在试验前配制,置于冰箱内不

表1 5种培养液中几种试剂的含量

培养液	丙酮酸钠 (克/升)	乳酸钠 75%糖浆 (克/升)	血清白 蛋白 (克/升)	小牛血清 (毫升/升)	绵羊血清 (毫升/升)
1 ¹⁾	0.025	2.3	3	—	—
2	0.025	2.3	—	30%	—
3	0.050	4.6	—	30%	—
4	0.025	2.3	—	—	30%
5	0.050	4.6	—	—	30%

¹⁾ Whitten 氏液

得超过两星期。小牛血清(上海食品公司牛羊部生产)和绵羊血清(本实验室自备),需经56°C水浴处理半小时,以除去血清中的补体。

(三) 胚胎的培养

实验共分3次进行。每次试验每只超排小鼠的胚胎约均分到各种培养液,以免去个体差异。采用指管培养,内盛0.5毫升培养液,每管放入20—30个2-细胞期胚胎,用混合气(5% CO₂, 5% O₂ 和 90% N₂) 在指管培养液面上充气1—2分钟,立即用橡皮塞紧塞,在37°C温箱内培养72或96小时。培养后,用吸管将胚胎从指管吸出,放在表面皿内,在实体显微镜下观察,记录胚胎发育阶段及其数量。用 χ^2 测定显著性。

结果与讨论

2-细胞期的小鼠胚胎在供试的5种培养液中都能够进一步发育(表2)。

Chen Xiulan et al.: *In vitro* Culture of Mammalian Embryos I. Development of Two-cell Embryos of Mouse

表 2 2-细胞期小鼠胚胎体外培养发育结果

试验批次	培养液	培养 2-细胞 胚胎数	培养 72 小时胚胎发育至				
			其他细胞 ¹⁾ [数(%)]	桑椹胚 [数(%)]	囊胚 [数(%)]	膨胀囊胚 [数(%)]	孵化 [数(%)]
I	1	101	66(65.3)	28(27.7)	7(6.9)	—	—
	2	107	59(55.1)	41(38.3)	6(5.6)	1(0.9)	—
	3	90	9(10.0)	48(53.3)*	14(15.6)*	19(21.1)	—
II	2	209	67(32.1)	38(18.2)	31(14.8)	54(25.8)	19(9.1)
	3	287	69(24.0)	53(18.5)	39(13.6)	79(27.5)	47(16.6)*
	4	252	94(37.3)	49(19.4)	42(16.7)	36(14.3)*	31(12.3)
	5	215	96(44.7)	50(23.3)	29(13.5)	22(10.2)**	18(8.4)**
			培养 96 小时胚胎发育至				
			其他细胞 [数(%)]	桑椹胚 [数(%)]	囊胚 [数(%)]	膨胀囊胚 [数(%)]	孵化 [数(%)]
III	2	247	19(7.7)	9(3.6)	35(14.2)	143(57.9)	41(16.6)
	3	243	20(8.2)	23(9.5)	25(10.3)	132(54.3)	27(11.1)

* 显著差异于 2 液。 ** 显著差异于 3 液。

1) 其他细胞指培养后仍停留在 2-细胞期胚胎、发育迟缓(8-细胞期以内)或退化、解体等胚胎。

第 I 次试验,用含有血清白蛋白的培养液体外培养 2-细胞期小鼠胚胎,72 小时后发育到桑椹胚和囊胚者占 34%,没有发育达膨胀囊胚的。我们估计这可能与小牛血清白蛋白制剂的质量有关。培养于 3 液和 2 液的 2-细胞期胚胎,72 小时后发育到桑椹期和囊胚的百分率,前者显著高于后者 ($P < 0.05$)。这两种溶液不同之处在于丙酮酸钠和乳酸钠的含量。已知这两种试剂有利于小鼠 8-细胞期以前的胚胎在体外发育^[2]。但我们的实验结果,究竟是由于丙酮酸钠和乳酸钠含量的增加,从而促进了胚胎更好的发育?还是由于增加了这两种试剂使两种溶液的 pH 值不同所致?尚需进一步研究。为此,我们用混合气调节溶液,使 2 液和 3 液的 pH 值一致(约为 7.2—7.3),进行了第 II 和第 III 次试验。在第 II 次培养试验中,培养于 2 液和 3 液的 2-细胞期胚胎,发育到桑椹期、囊胚和膨胀囊胚的百分率没有差异,而孵化率(孵化率为胚胎正在或已经钻出透明带的百分率)却有差异,培养于 3 液者显著高于 2 液 ($P < 0.01$)。在第 III 次培养时,延长了培养时间,2 液的孵化率反而高于 3 液,但差异不显著。无

论 2 液或 3 液,当体外培养 96 小时后,发育到膨胀囊胚的百分率增高,但孵化率没有提高。原因可能正如文献记载的那样,丙酮酸钠可以促进胚胎的发育,但不能促进囊胚的孵化^[2]。我们的试验结果与此相符。

综合上述 3 次试验,可以得到如下认识:

1. 用国产的试剂,以 Whitten (1971) 氏液为基本溶液,加 30% 的小牛血清代替血清白蛋白(培养液 2)体外培养 2-细胞期小鼠胚胎 96 小时,可有 57.9% 的胚胎发育到膨胀囊胚期,16.6% 的胚胎可发育到孵化期(参见表 2)。

2. 在基本液中,以 30% 的绵羊血清代替白蛋白(培养液 4 和 5)培养小鼠 2-细胞期胚胎,同样可以支持胚胎的发育,且发育到桑椹胚和囊胚的百分率与用小牛血清培养的结果相似,但发育到膨胀囊胚的则显著降低 ($P < 0.01$)。因此,在没有小牛血清的情况下,也可以用绵羊血清,其优点在于取材方便,可以自备。

3. 体外培养哺乳动物胚胎,一般在培养液上用液体石蜡油覆盖,然后置于 CO₂ 培养箱内培养。我们采用指管培养,加塞前用混合气充气 1—2 分钟,置于普通温箱中培养。在没有

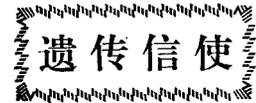
CO₂ 培养箱的情况下,这种方法还是可取的。

实验虽取得了一些结果,但还存在一些问题,如出现发育有些迟缓的现象(小鼠胚胎在体内正常发育4天,几乎全部从透明带孵出)。Wright (1978)^[43] 用滴培养法培养2-细胞期小鼠胚胎,孵化率达57.6%,而本实验的孵化率只有16.6%,等等。今后需要进一步找出胚胎发育迟缓的原因。

参 考 文 献

[1] Brinster, R. L.: 1963. *Exp. Cell Res.*, 32: 205.
[2] ————: 1965. *J. Exp. Zool.*, 158: 59—68.
[3] ————: 1968. *J. Anim. Sci.*, 27 (Suppl.)

1: 1—4.
[4] Kane, M. T. and R. H. Foote: 1971. *Biol. Reprod.*, 4: 41—47.
[5] Kane, M. T. and D. R. Headon 1980. *J. Reprod. Fert.*, 60: 469—475.
[6] McLaren, A. and J. D. Bigger: 1958. *Nature*, 187: 877.
[7] Whitten, W. K.: 1956. *ibid*, 179: 96.
[8] Whitten, W. K.: 1957. *ibid*, 179: 1081.
[9] Whitten, W. K. and J. D. Bigger: 1968. *J. Reprod. Fert.*, 17: 399.
[10] Whitten, W. K.: 1971. *Advan. Biosci.*, 6: 129—139.
[11] Whittingham, D. G.: 1971. *J. Reprod. Fert.*, (Suppl.) 14: 7—21.
[12] Whittingham, D. G. and B. D. Bavister: 1974. *J. Reprod. Fert.*, 38: 489—492.
[13] Wright, R.: 1978. *Anim. Reprod. Sci.*, 1: 181.



妊娠早期产前诊断的研究

I. 绒毛细胞直接制备染色体

崔梅影 陈保江¹⁾ 周宪庭

(中国科学院遗传研究所,北京)

韩路亚 廖琼珍 高艳萍

(北京红十字朝阳医院妇产科)

通过绒毛活体取样,进行孕早期产前诊断已成为遗传疾病预防的一个新的方向。

绒毛滋养层细胞是受精卵有丝分裂的衍生物,它准确地反映了胎儿的遗传特性。妊娠早期的绒毛有较高的有丝分裂活性,这些特点为用直接法制备胎儿染色体、在孕早期检出染色体异常胎儿提供了有利条件。

我们选择怀孕6—9周人工流产的妇女为实验对象,用盲吸法和ADR-B型超声波定位法,吸取胚胎种植部位附近的叶状绒毛。取样后,在解剖镜下挑选绒毛,剔除母体组织污染。组织经秋水仙胺处理、低渗、固定等制成染色体标本。经过这样挑选的绒毛,一般都可见到有丝分裂相。

从盲吸法和超声波定位法中得到70个典型的绒

毛样本,染色体分析结果29例为男性,41例为女性,平均每个样本可见20—30个分裂相。对男性胎儿用Q显带鉴定Y染色体。

从实验中体会到:1.直接法大大缩短了产前诊断的时间,一般取材2—3小时后即可得到结果,避免了中期引产;2.由于母体蜕膜组织极少能见到分裂相,本法可以避免母体细胞污染;3.取材是成功的关键,如能得到理想的标本,就能得到很高的成功率。

Chui Meiyong et al.: Study on First Trimester Prenatal Diagnosis I. Direct Preparation of Chromosome in Chorionic Villi.

1) 吉林省计划生育研究所。