

序贯共培养体系对小鼠体外受精胚胎发育效果的影响

王益兵 朱广琴 宋宇轩 王建刚 董彬 曹斌云* (西北农林科技大学动物科技学院, 陕西杨凌712100)

摘要 采用体外分离培养的兔输卵管上皮细胞和子宫内膜细胞构建了序贯共培养体系,并与体外受精得到的受精卵进行共培养。试验结果表明,HIF液受精率显著高于T6液($P < 0.05$),更适用于卵母细胞的体外受精。序贯共培养体系和输卵管上皮细胞培养组2-细胞率都显著高于单独培养液组和子宫内膜细胞培养组($P < 0.05$),二者均可克服2-细胞阻滞。序贯共培养体系胚胎的囊胚体外发育率显著高于其他共培养组($P < 0.05$)。表明序贯共培养体系比单一体细胞共培养体系能更好地模拟体内环境,提高早期胚胎的体外发育率。

关键词 序贯共培养体系;输卵管上皮细胞;子宫内膜细胞;体外受精;胚胎

中图分类号 Q954.4 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)18-05429-03

Effect of Sequential Co-culture System on the Development and Quality of Murine Embryos Fertilization in Vitro

WANG Yi-bing et al (Animal Sci-Tech College of Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract The oviduct epithelial cells and endometrial cells were isolated and cultured in vitro and constructed sequential co-culture system, and this system was used for co-culture with fertilized egg in vitro. The results showed that HIF had higher rate of fertilization compared to T6 ($P < 0.05$), suitable for oocyte fertilization in vitro. More 2-cell rate in the sequential co-culture system and oviduct epithelial cells culture system was than single media and endometrial cells culture system, they both can efficiently overcome embryo development retardation after 2-cell stage. More embryos in the sequential co-culture system reached in the blastocyst stage were than that in other co-culture system ($P < 0.05$). This study demonstrated that the sequential co-culture system can better simulate the natural developing environment of embryos in vitro and improve the development rate and quality of early embryo.

Key words Sequential co-culture; Oviduct epithelial cell; Endometrial cell; In vitro fertilization; Embryo

动物体外受精(IVF)研究已有100余年的历史。IVF技术对于揭示配子发育、成熟、受精和早期胚胎细胞分化等生命现象的奥秘具有重要的意义。在体外受精的操作过程中,卵母细胞可以自发成熟,但是受精、卵裂及早期胚胎体外发育的成功率都很低,而且体外受精胚胎体外发育也存在发育阻滞问题。为了更好地模拟卵母细胞和早期胚胎在体内发育的微环境,促进体外受精的成功,国内外研究者在近几年做了大量试验。哺乳动物早期胚胎的发育始于输卵管,然后进入子宫,最终在子宫发育为胎儿。以前的胚胎体外共培养研究仅限于某种细胞与胚胎一直共培养到囊胚,这种体系虽然提高了胚胎体外发育率及发育质量,但仍然不能很好地模拟体内发育环境。该研究将昆明白小鼠体外受精胚胎与家兔输卵管上皮细胞和子宫内膜细胞进行序贯共培养,即模拟胚胎在体内自然发育的过程,先将胚胎与输卵管上皮细胞共培养一段时间后,再与子宫内膜细胞共培养,观察其对胚胎体外发育率的影响,以期对胚胎体外培养提供一个新的方法。

1 材料与方 法

1.1 试剂及器材 DMEMF12培养液(Gibco公司);D PBS平衡盐溶液、T6液(自配)^[1-2]、HIF液(自配)^[2]和KSOM AA(自配)培养液^[2];胎牛血清(FBS)(Sigma公司);PMSG、hCG、胰蛋白酶和液体石蜡油(Sigma公司);25 cm²培养瓶及四孔板(NUNC公司);CO₂培养箱(美国热电公司);体视镜和倒置相差显微镜(厦门麦克奥迪公司)。

1.2 兔子宫及输卵管的采集 采用4月龄2 kg左右新西兰大白兔为试验动物,术前3 d 16:00 股部肌肉注射100 IU PMSG,术前1 d 16:00 耳缘静脉注射75 IU hCG,手术当日8:30

耳缘静脉注射5 ml 空气处死,消毒腹部,打开腹腔取双侧子宫及输卵管,置D PBS平衡液中。

1.3 输卵管上皮细胞的分离和培养 超净台内切除输卵管,用PBS反复冲洗输卵管几次,去除血污后用眼科剪和眼科镊分离、剪去周围的粘连组织。在平皿中将输卵管纵向剪开,平展在平皿中,用手术刀刮取输卵管上皮细胞,加入0.25%胰酶消化10 min,加入血清终止胰酶消化。消化过程中要吹打数次使内膜充分消化。吸取消化液,经滤网过滤后至5 ml离心管中1 000 r/min离心5 min,弃上清液,加入培养液吹打制成细胞悬液。进行细胞计数,调整细胞浓度为10⁵个/ml接种于35 mm培养皿(NUNC)中,加入含100 U/ml青霉素及100 U/ml链霉素的DMEMF12,放入37℃、5%CO₂饱和湿度的培养箱中培养。待输卵管上皮细胞长至80%汇合或刚汇合时;即可接种于四孔板培养传代。

1.4 子宫内膜细胞分离培养 将采取的子宫用PBS洗清血渍,在超净台上剪开,用手术刀轻刮子宫内膜,刮取物置于培养皿中,加入0.25%胰酶消化10 min,少量FBS终止消化。如此重复消化若干次,消化液过筛网(筛孔直径0.128 mm)除去未消化组织,滤液转入5 ml离心管中加入DMEMF12培养液,1 000 r/min离心5 min,弃上清液,沉淀加培养液重悬后,接种于预先置有DMEMF12(含体积分数10% FBS、100 U/ml青霉素及100 U/ml链霉素的35 mm培养皿(NUNC)中,37℃、5%CO₂饱和湿度培养。待子宫内膜细胞长至80%汇合或刚汇合时,即可进行传代,传代时接种于4孔板培养。

1.5 小鼠卵母细胞体外成熟及体外受精

1.5.1 试验动物。试验所用的昆明白鼠均购自第四军医大学试验动物研究中心。

1.5.2 精子的收集与获能。颈椎脱臼法处死采集精子的公鼠,分离附睾尾及输精管,挤出附睾尾精子,分别置于T6液和HIF液中,轻晃培养皿使精子浮游,将培养皿放入培养箱中静置1 h使精子获能。观察精子活力并计数测定精子浓度,使受精时精子浓度在1×10⁶个/ml左右。制备含获能精子的HIF受精液微滴置培养箱待用。

基金项目 国家高技术研究发展计划(863计划)项目(2002AA42051)。

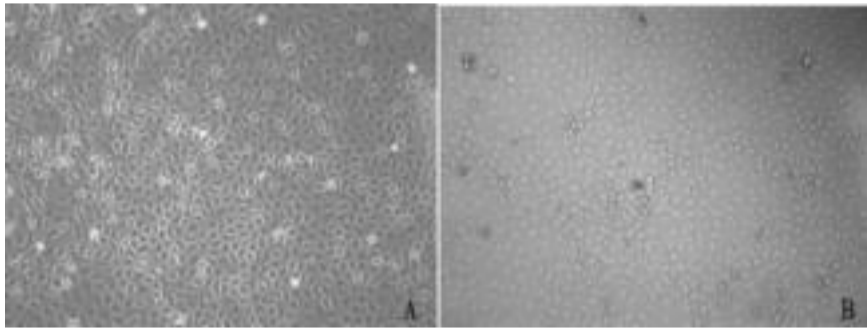
作者简介 王益兵(1979-),男,陕西眉县人,硕士研究生,研究方向:动物生殖生理与调控。* 通讯作者,博士生导师, E-mail: caobinyun@yahoo.com.cn。

收稿日期 2007-03-13

1.5.3 母鼠超排处理和卵母细胞采集。选取7~8周龄阴道口呈粉红的昆明白雌性小鼠,16:00左右,每只小鼠腹腔注射PMSG 10 IU。48 h后,每只小鼠腹腔注射hCG 10 IU,16 h后颈椎脱臼法处死雌鼠,迅速剥离输卵管,于体视镜下撕裂壶腹部使卵丘-卵母细胞团流出,检出卵丘-卵母细胞团,用含300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 透明质酸酶的培养液去卵丘细胞。

1.5.4 精卵共孵育及受精判别。随机分组将卵母细胞放入含有获能精子的受精液微滴中,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度的培养箱中孵育。3~4 h后收集成熟卵母细胞,观察受精的卵母细胞中2个原核存在与否及第2极体是否排放,将受精卵随机分组移入各试验组中。

1.6 试验设计及观测指标 试验设4个处理,受精卵4孔板培养,每孔500 μl KSOMAA 培养液,石蜡油封顶。处理以KSOMAA为培养液(记为K);处理以KSOMAA加输卵管上皮细胞为培养体系(记为O);处理以KSOMAA加子宫内膜细胞为培养体系(记为E);处理以KSOMAA为培养液,受精卵培养的前48 h在输卵管上皮共培养体系中,以后则转入子宫内膜细胞共培养体系中培养(序贯共培养记为O48+E)。统计各处理2-细胞、4-细胞胚、桑椹胚及囊胚发育率。



注:A为原代,B为1代。下图同。

图1 家兔输卵管上皮细胞($\times 50$)

2 结果与分析

2.1 家兔输卵管上皮细胞的体外培养及传代 家兔的输卵管上皮细胞原代培养2~3 d细胞贴壁,生长旺盛,成簇生长,

排列紧密。培养6~9 d,细胞铺满皿底,长成单层。传代细胞5~6 d长成单层。细胞呈不规则的多角形或圆形,呈铺路石状(图1)。

2.2 家兔子宫内膜细胞体外培养及传代 培养的家兔子宫内膜细胞包括子宫内膜腺上皮细胞和基质细胞,腺上皮细胞贴壁后长成致密单层细胞集落,细胞呈多角形,边界清楚,排列紧密时呈典型“铺路石”状;基质细胞则是具有成纤维细胞形态的梭形细胞,胞浆丰富,易传代,长期培养后细胞延伸成梭形,相互平行排列成束,密度大的区域聚集成涡旋状(图2)。

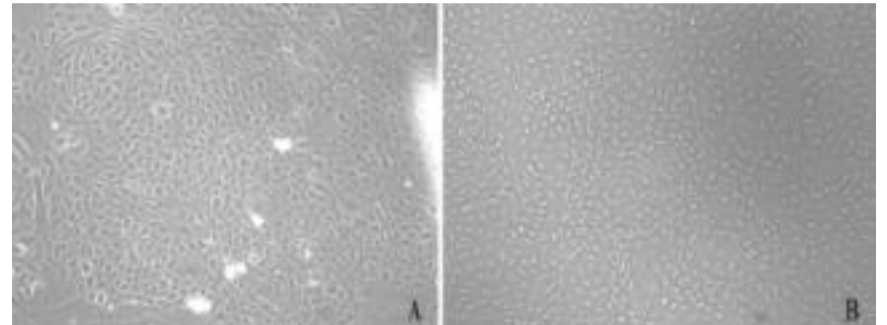


图2 家兔子宫内膜细胞($\times 100$)

2.3 2种获能受精液与小鼠卵母细胞体外受精后获得的受精率 结果见表1。

表1 2种获能受精液与小鼠卵母细胞体外受精后获得的受精率

受精获能液	供卵鼠数	卵母细胞数	卵裂卵数	受精率 %
HIF	18	363	325 a	89.5
T6	19	341	221 b	64.8

注:表中同一列数据带不同小写字母者表示差异显著($P < 0.05$)。

由表1可见,HIF的体外受精率显著高于T6($P < 0.05$),表明小鼠成熟的卵母细胞适宜选用HIF液进行体外受精。

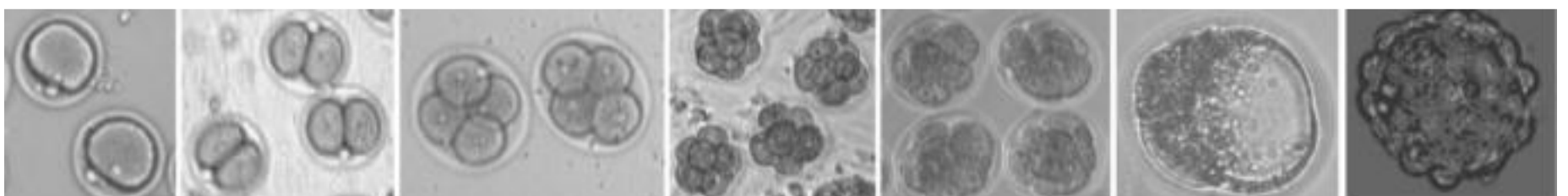
2.4 不同培养体系对小鼠体外受精胚胎体外发育的影响

由表2可见,K组的囊胚率显著低于子宫内膜细胞共培养E组($P < 0.05$),极显著低于输卵管上皮共培养O组和序贯共培养O48+E组($P < 0.01$)。序贯共培养O48+E组囊胚发育率则显著高于输卵管上皮及子宫内膜细胞共培养组($P < 0.05$)。序贯共培养组的胚胎发育正常(图3)。

表2 不同培养体系对小鼠体外受精胚胎体外发育率的影响

处理	胚胎总数	2-细胞			4-细胞			桑椹胚			囊胚		
		数量	所占比例 %	%	数量	所占比例 %	%	数量	所占比例 %	%	数量	所占比例 %	%
K	85	39 a	45.9		34 aA	40.0		27 aA	31.8		16 aA	18.8	
O	87	57 b	65.5		53 bB	60.9		40 bA	46.0		33 bAB	37.9	
E	85	48 a	56.5		43 cB	50.6		36 bA	42.4		29 bA	34.1	
O48+E	84	53 b	63.1		49 bB	58.3		42 cC	50.0		38 cB	45.2	

注:表中同一列数据带不同大、小写字母者分别表示 $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ 。



注:1.成熟卵母细胞($\times 100$);2.2-细胞期($\times 100$);3.4-细胞期($\times 100$);4.8-细胞期($\times 100$);5.桑椹胚($\times 100$);6.囊胚($\times 200$);7.孵化囊胚($\times 200$)。

图3 序贯共培养的小鼠早期胚胎在体外的发育

3 结论与讨论

小鼠卵母细胞体外受精技术是研究受精生理的重要手段,而研究小鼠胚胎在体外的发育是研究哺乳动物胚胎发育的常规方法之一。因此,小鼠体外受精技术已在生物学研究

许多领域得到应用。胚胎在体内发育过程中,与生殖道之间有着极为密切的双向交流,生殖道上皮及一些间质细胞分泌的细胞因子对胚胎的发育有很大的影响。因此有研究者采用体细胞与胚胎在体外建立共培养体系进行胚胎培养。所

谓胚胎共同培养体系是指在培养基内加入一些辅助细胞与胚胎一起培养^[3-5]。胚胎共同培养的好处是一方面与胚胎共同培养的细胞能分泌一些物质,去除胚胎培养过程中所分泌的一些毒素^[6];另一方面共培养细胞本身也会分泌一些活性因子,促进胚胎发育到囊胚期;再者共培养体系可以改善胚胎体外培养的条件,模拟体内的自然环境,促进早期胚胎的体外发育,克服发育过程中的阻断,增加囊胚期的胚胎数,使胚胎移植在更适宜时间进行,提高着床率^[7-8]。胚胎共培养体系常采用的细胞有输卵管上皮细胞、子宫内上皮细胞、卵丘细胞及猴肾脏上皮细胞等^[9]。

卵母细胞由卵巢排出后在输卵管壶腹部受精形成受精卵。输卵管是胚胎发育的起始地,输卵管可以分泌活性因子刺激胚胎发育,但对前期胚胎的发育促进作用更为明显。而子宫是胚胎发育的最终场所,子宫内膜是子宫的主要功能层,因此亦有许多胚胎共培养体系以子宫内膜细胞为辅助细胞。卵母细胞和精子结合形成受精卵在输卵管40~48 h后发育到桑椹胚进入子宫角。因此从8细胞阶段到囊胚阶段的早期胚胎主要在子宫发育。依据这一生理基础,该试验将体外受精获得的小鼠受精卵前48 h内在输卵管上皮共培养体系中培养,然后转移至子宫内膜细胞共培养体系中培养,目的是更好地模拟胚胎体内发育环境。与其他处理相比,序贯共培养体系胚胎的囊胚体外发育率显著高于其他共培养组($P < 0.05$)。试验结果表明,序贯共培养体系可以更好地促进小鼠早期胚胎的体外囊胚发育率,且可以有效地克服早

期胚胎体外发育的阻滞现象。

研究结果表明,用HIF液使精子在体外获能可以使卵母细胞获得很高的受精率,序贯共培养体系可以在体外为胚胎发育提供一种更类似于体内的环境,可以有效地提高体外受精胚胎的囊胚发育率。该研究为胚胎工程的发展及不育不孕症的治疗提供了一个试验依据。

参考文献

- [1] 李青旺. 动物细胞工程与实践[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 426.
- [2] ANDRAS NAGY, MARINA GERISENSTEIN, KRISIINA VINTERSTEN, et al. 小鼠胚胎实验操作手册[M]. 孙青原, 陈大元, 译. 北京: 化学工业出版社, 2005: 149, 417.
- [3] PEGORARO L M, THUARD J M, DELALLEAUN, et al. Comparison of sex ratio and cell number of IVF/MF bovine blastocysts co-cultured with bovine oviduct epithelial cells or with Vero cells[J]. *Theiogenology*, 1998, 49(8): 1579 - 1590.
- [4] LARRY I, BARMAT MD, HUNG CHING LIU, et al. Human preembryo development on autologous endometrial coculture versus conventional media[J]. *Fertility and Sterility*, 1998, 70(6): 1109 - 1113.
- [5] CARLOS S, AMPARO M, JUAN G V, et al. Co-culture of human embryos with autologous human endometrial epithelial cells in patients with implantation failure[J]. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1999, 84(8): 2638 - 2646.
- [6] KANE MT. The role of nutrients, peptide growth factors and co-culture cells in development of preimplantation embryos in vitro[J]. *Theiogenology*, 1992, 38: 297 - 313.
- [7] REXROAD CE, POWELL AM. Development of ovine embryos co-cultured on oviduct cells, embryonic fibroblasts, or STO cell monolayers[J]. *Bd Reprod*, 1993, 49: 789.
- [8] MEYER M W, BROUSSARD J R, MENEZO Y, et al. Established cell lines and their conditioned media support bovine embryo development during in vitro culture[J]. *Hum Reprod*, 1994, 9: 927.
- [9] 叶新红, 徐国江, 严敬明. 输卵管上皮细胞共培养技术对受精卵体外发育的影响及临床应用价值[J]. *生殖与避孕*, 2001, 21(3): 183.