

Vero 细胞共培养体系对猪胚胎早期发育的影响

付博¹, 马红^{1,2}, 任亮¹, 赵金凤¹, 房庆昌¹,

郭镇华², 李忠秋², 刘娣^{1,2*}

(1. 东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省农业科学院, 哈尔滨 150086)

摘要: 本研究旨在探讨 Vero 细胞共培养体系对猪胚胎早期发育的影响。收集屠宰场废弃卵巢, 抽取卵母细胞。采用电激活联合化学激活的方法得到孤雌胚胎, 同时用所得的卵母细胞与卵丘细胞构建猪体细胞核移植重构胚; 并将所得的孤雌胚、核移植重构胚移入 NCSU-23 (培养液) 中与 Vero 细胞共培养。结果, Vero 细胞共培养组的囊胚率显著高于对照组 ($P < 0.05$), 各组囊胚细胞数无显著差异 ($P > 0.05$)。结果表明, Vero 细胞作为共培养体系中的滋养层细胞有利于猪胚胎的早期发育。

关键词: 猪; Vero 细胞; 共培养体系; 孤雌胚; 体细胞核移植

中图分类号: S814.8; Q813.1

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)08-0962-05

Effect of Co-culture System with Vero Cells on the Development of Porcine Embryos

FU Bo¹, MA Hong^{1,2}, REN Liang¹, ZHAO Jin-feng¹, FANG Qing-chang¹,

GUO Zhen-hua², LI Zhong-qiu², LIU Di^{1,2*}

(1. College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

2. Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China)

Abstract: This study was conducted to investigate the effect of co-culture system with Vero cells on the development of porcine embryos. Ovaries were recovered from slaughterhouse, and oocytes were extracted. Oocytes were activated with electrical stimulation combined with chemical stimulation, then parthenogenetic embryos were obtained. Cloned embryos were constructed with porcine cumulus cells and oocytes. Cloned embryos and parthenogenetic embryos were co-cultured with Vero cells in NCSU-23 (culture medium). The results showed that groups co-cultured with Vero cells achieved significantly higher blastocyst formation rate compared with control ($P < 0.05$), while there was no significant difference for the cell number of blastocysts ($P > 0.05$). The result indicated that co-culture system with Vero cells improved the development of porcine embryos *in vitro*.

Key words: porcine; Vero cells; co-culture system; parthenogenetic embryos; somatic cell nuclear transfer

自“多利”羊问世以来, 体细胞克隆技术已取得了长足的发展; 然而, 猪的体细胞克隆研究进展相对缓慢, 其原因是猪的卵母细胞脂肪含量高, 体外操作难度大, 体外培养得到的优质胚胎数有限。因此, 优化猪胚胎体外培养环境成为了众多研究者关注的内

容; 共培养体系也逐渐应用到了猪胚胎体外培养过程中。目前, 应用于猪胚胎体外共培养体系的体细胞有: 子宫内膜细胞、牛成纤维细胞、输卵管上皮细胞等^[1-3]; 然而, 它们的滋养效果却不理想; 寻找其它效果更好的滋养层细胞成为优化猪胚胎体外培养的

收稿日期: 2009-08-20

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划重点项目(2008BADB2B02); 转基因生物新品种培育重大专项(2008ZX08006-003)

作者简介: 付博(1978-), 男, 黑龙江阿城人, 博士生, 主要从事胚胎工程研究, E-mail: fubohao810@163.com

* 通讯作者: 刘娣, E-mail: liudi1963@163.com

一条可行途径。

非洲绿猴肾细胞(Vero)是由 Yasumura 和 Kawakita 在日本千叶大学于 1962 年 3 月 27 日从正常成年非洲绿猴肾分离培养,后经衍化得到的一种异倍体细胞。除用作病毒适应细胞外,Vero 细胞已被广泛应用于人类胚胎的体外共培养^[4-5],并且近年来逐渐应用到大型家畜胚胎的体外共培养^[6-8]。然而,Vero 细胞尚未应用于猪的胚胎共培养。本研究旨在探讨 Vero 细胞共培养猪胚胎的过程中 Vero 细胞对猪孤雌胚和核移植胚体外发育的影响,为提高猪体细胞核移植效率奠定基础。

1 材料与方法

除特别说明外,所有化学试剂均购自 Sigma Aldrich 公司(St. louse, MO);猪卵巢采集地点为哈尔滨市肉联公司屠宰场。Vero 细胞由东北农业大学动物医学院李一经教授惠赠。

1.1 卵母细胞体外成熟培养

使用配有 18G 针头的 20 mL 注射器从 3~6 mm 的有腔卵泡中抽吸卵丘-卵母细胞复合体(Cumulus-Oocyte complex),采卵液为 TCM-199 (Hank's)。在体视显微镜下,选取表面包裹 3 层以上卵丘细胞,致密,而且胞质均匀的卵丘-卵母细胞复合体(Cumulus-Oocyte complexes, COCs),以 TCM-199 (Earle's)+10%猪卵泡液(pFF)+0.57 mmol·L⁻¹半胱氨酸(L-cysteine)+10 ng·mL⁻¹表皮生长因子(EGF)+10 IU·mL⁻¹孕马血清促性腺激素(PMSG)+10 IU·mL⁻¹人绒毛膜促性腺激素(hCG)猪卵母细胞体外成熟培养液进行成熟培养(5% CO₂, 39 °C、饱和湿度)。培养 22 h 后,再将卵母细胞移入无 PMSG 和 hCG 的成熟培养液中继续培养 22 h。

1.2 核供体卵丘细胞分离培养

采取 1 头母猪的卵巢,收集卵丘-卵母细胞复合体(COCs)。将成熟培养 44 h 的 COCs 移入 0.1%透明质酸酶(Sigma 产品)中,在 38.5 °C 孵育 4 min,捡取卵母细胞后用等体积 10% FBS DMEM(Gibco 产品)培养液终止消化,以 1 500 r·min⁻¹离心 5 min,收集卵丘细胞,调整单细胞悬液密度为 5×10⁵个·mL⁻¹,接种到 35 mm 培养皿中,于 38.5 °C、5% CO₂和饱和湿度的二氧化碳培养箱中培养。细胞生长达到 80%汇合时进行传代。在显微操作前 1 h 用胰蛋白酶消化、离心,收藏于 4 °C 备用。

1.3 Vero 细胞单层共培养体系的构建

Vero 细胞培养液为添加 10% FBS、10 U·mL⁻¹青霉素和 10 μg·mL⁻¹链霉素的 DMEM。Vero 细胞培养过程中不使用其它药物处理或抑制。当细胞生长至 80%~90%汇合时传代,以密度为 5×10⁵个·mL⁻¹的悬液接种于 4 孔板,即可作为共培养系统,使用前将细胞培养液换成相应的胚胎培养液。

1.4 卵母细胞孤雌激活

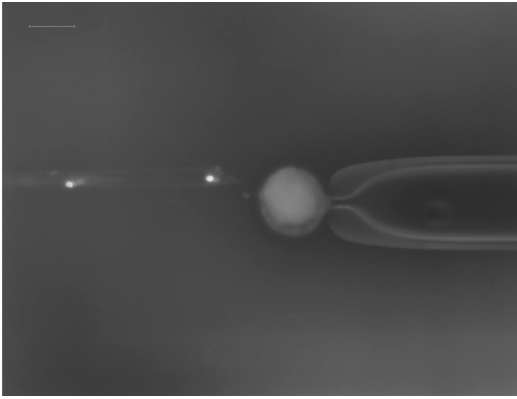
成熟培养 44 h 后,将成熟的卵母细胞移入脱卵丘液中反复吹打,脱去卵丘细胞。选取卵丘细胞扩散,卵周隙明显、卵黄膜完整且排出第一极体的卵母细胞,先用 39 °C 预温的激活液洗涤 3 遍(激活液配方参考文献[9]),并在其中平衡 1 min,再将平衡好的卵母细胞转移到已经铺满激活液的融合槽中,按照本试验所设定电融合仪参数(激活参数为 1 次脉冲,1.8 kV·cm⁻¹,30 micros)进行直流脉冲刺激;静置 1 min 之后,将卵母细胞用 NCSU-23 + 4 mg·mL⁻¹ BSA + 2 mmol·L⁻¹ 6-DMAP 洗涤 5 遍,然后将卵母细胞转移到该培养液培养 4 h。再将其转移到 NCSU-23+4 mg·mL⁻¹ BSA 胚胎培养液,在 39 °C、5% CO₂、饱和湿度的条件下培养。

1.5 重构胚构建

卵丘细胞传代 4 次待细胞生长至汇合时,继续培养 1~2 d 后,消化离心,加 1 mL 操作液重悬细胞备用。重构卵/胚胎构建:将成熟卵母细胞转入显微操作液(NCSU-23 Hepes 缓冲且含有 10 μg·mL⁻¹ CB 和 5 μg·mL⁻¹ Hoechst33342),利用显微操作盲吸法进行卵母细胞去核,即吸取第一极体及其临近 10%~20%可能含有卵母细胞核的胞质。在荧光显微镜下观察卵母细胞去核情况(注核针内含有第一极体及细胞核物质为去核成功),如图 1 所示。然后用同一注核针将体细胞从去核切口放入卵周隙,用注核针点压透明带,使供核细胞与卵母细胞接触紧密。操作一批结束后将供体细胞-卵胞质重构胚转移到 NCSU-23 + 4 mg·mL⁻¹ BSA 中,在 39 °C、5% CO₂、100%湿度培养箱中恢复 1.5 h。

1.6 重构胚融合激活

在体视显微镜下判定融合(供核细胞融合入受体胞质内即为融合的重构胚),再用 39 °C 预温的激活液洗涤 3 遍,并在其中平衡 1 min,再将平衡好的卵母细胞转移到已经铺满激活液的融合槽中,用实心玻璃针拨动重组卵,使供体细胞-受体卵细胞膜接触面与电极平行,进行直流脉冲刺激(激活参数为 1



第一极体及核物质被吸出卵母细胞

Both first polar body and nuclear are aspirated out from oocyte

图1 卵母细胞荧光染色辅助去核(标准比例尺 100 μm)

Fig. 1 Enucleated oocytes stained with fluorescent dye (Bar represents 100 μm)

次脉冲, $1.8 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$, 30 micros): 静置 1 min 之后, 将卵母细胞用 NCSU-23 + $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ BSA 洗涤 5 遍, 然后将卵母细胞转移到矿物油覆盖并在二氧化碳培养箱中预平衡至少 4 h 的 NCSU-23 + $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ BSA + $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-DMAP 液滴内, 在 39°C 、 $5\% \text{ CO}_2$ 、饱和湿度的条件下培养 4 h。

1.7 胚胎培养

将融合激活后的重构胚在 NCSU-23 + $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ BSA 中洗涤 3 遍, 然后转入矿物油覆盖并预先在二氧化碳培养箱中平衡至少 2 h 的 Vero 细胞液滴内培养。每 48 h 完全换液。融合激活 48 h 后记录卵裂率(如图 2), 144 h 后记录囊胚形成率, 并观察囊胚细胞数, 具体方法参看文献[10]。

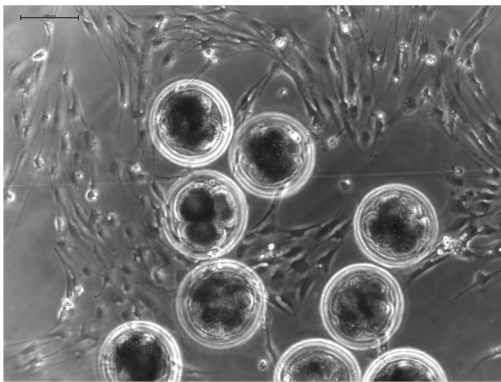


图2 与 Vero 细胞共滋养的克隆胚胎(标准比例尺 100 μm)

Fig. 2 The cloned embryos co-cultured with Vero cells (Bar represents 100 μm)

1.8 试验设计

试验一: 卵母细胞孤雌激活后, 移入 NCSU-23 培养液(Vero 细胞单层共培养), 同时移入无 Vero 的 NCSU-23 培养液作为对照。

试验二: 核移植重构胚融合激活后, 移入 NCSU-23 培养液(Vero 细胞单层共培养), 同时移入无 Vero 的 NCSU-23 培养液作为对照。

1.9 统计分析

试验数据用 Mean \pm SE 表示。卵裂率、囊胚率、囊胚细胞数的数据用 SPSS 17.0 的 Independent-Samples T test 过程进行分析。每个处理重复 3 次。当 $P < 0.05$ 时认为差异显著。同一列中数据的上角标不同表示差异显著($P < 0.05$)。

2 结果

猪孤雌胚胎和核移植胚胎的早期发育潜力的评判指标主要包括囊胚率和胚胎细胞计数。卵母细胞激活后 48 h 观察卵裂数, 激活后 144 h 观察囊胚数和囊胚细胞数。

2.1 共培养体系中 Vero 细胞对孤雌胚发育的影响

分两组进行试验(分别为无 Vero 细胞培养组和 Vero 细胞共培养组), 重复 3 次, 2 组试验各取 150 枚成熟卵母细胞用于孤雌激活。由表 1 可知, Vero 细胞共滋养组的孤雌胚囊胚率显著高于对照组($68.0 \pm 2.3\%$ vs $41.3 \pm 2.6\%$, $P < 0.05$)。但两处理的卵裂率($82.6 \pm 3.5\%$ vs $85.3 \pm 1.3\%$)和囊胚细胞数(37.0 ± 0.6 vs 37.3 ± 0.5)均无显著差异($P > 0.05$)。说明 Vero 细胞共滋养可显著提高孤雌胚的囊胚率, 但不能增加孤雌胚的细胞数。

2.2 共培养体系中 Vero 细胞对核移植胚发育的影响

分两组进行试验(分别为无 Vero 细胞培养组和 Vero 细胞共培养组), 重复 3 次, 猪卵丘细胞接触抑制 2 d 后, 胰酶消化, 收藏于 4°C 储存, 用作核移植供体细胞。两组试验各取 120、125 枚核移植重构胚用于激活。由表 2 可知, Vero 细胞共滋养组的核移植胚的囊胚率显著高于对照组($17.5 \pm 1.4\%$ vs $8.3 \pm 2.2\%$, $P < 0.05$)。但两处理的卵裂率($65.0 \pm 5.0\%$ vs $61.6 \pm 4.4\%$), 囊胚细胞数(34.6 ± 2.6 vs 33.3 ± 2.0)均无显著差异($P > 0.05$)。提示, 培养体系中的 Vero 细胞可能有助于核移植胚的发育; 但共培养体系中的 Vero 细胞不能增加核移植胚的细胞数。

表 1 Vero 细胞对孤雌胚体外发育的影响

Table 1 Effect of Vero cells on the *in vitro* development of parthenogenetic embryos

培养类型 Type of culture	培养激活卵数 No. of oocytes used	卵裂数(%±SE) No. of cleaved embryos	囊胚数(%±SE) No. of blastocysts	囊胚细胞数 (\bar{x} ±SE) No. of cells
无 Vero 细胞共培养 Culture without Vero cells	150	128(85.3±1.3) ^a	62(41.3±2.6) ^b	37.3±0.5 ^a
Vero 细胞共培养 Culture with Vero cells	150	124(82.6±3.5) ^a	102(68.0±2.3) ^a	37.0±0.6 ^a

同列数据后所标字母相异表示差异显著($P<0.05$),所标字母相同表示差异不显著($P>0.05$)。下表同

Different letters in the same column mean significant difference between the treatments($P<0.05$), the same letter in the same column means not significant difference between treatments($P>0.05$). The same as below

表 2 Vero 细胞对核移植胚体外发育的影响

Table 2 Effect of Vero cells on the *in vitro* development of somatic nuclear transferred embryos

培养类型 Type of culture	培养激活卵数 No. of oocytes used	卵裂数(%±SE) No. of cleaved embryos	囊胚数(%±SE) No. of blastocysts	囊胚细胞数 (\bar{x} ±SE) No. of cells
无 Vero 细胞共培养 Culture without Vero cells	120	74(61.6±4.4) ^a	10(8.3±2.2) ^b	33.3±2.0 ^a
Vero 细胞共培养 Culture with Vero cells	125	78(65.0±5.0) ^a	22(17.5±1.4) ^a	34.6±2.6 ^a

3 讨 论

共培养体系中,滋养层细胞克服了种属及组织差异性,故用于共培养的辅助细胞有很多种。目前常用于猪胚胎共培养的细胞主要有输卵管上皮细胞、子宫内膜细胞、牛成纤维细胞等;本试验采取 Vero 细胞为滋养层细胞,为猪核移植胚的体外共培养提供了一条新途径。由于 Vero 细胞易于培养,对胚胎的发育有促进作用,Vero 细胞已被广泛应用于哺乳动物早期胚胎的共培养^[11]。Desai 等检测到人 IVF 胚胎与 Vero 细胞共培养时 Vero 细胞能释放多种细胞因子,生长因子。体外培养的胚胎始终处于生长因子和细胞因子浓度升高的动力学环境中。正是这样有利的培养微环境促进了胚胎的体外发育^[5]。Vero 细胞有利于哺乳动物胚胎早期发育的主要原因可能是:1)Vero 作为滋养层细胞可以代谢和吸收抑制胚胎发育的物质^[12];2)Vero 细胞分泌多种可促进细胞生长的因子,其中包括 CSF、FGFs、IGFs、IGF-I、IGF-II、ILs、LIF、PDGF、SCF 和 TGF- α ,从而促进了胚胎的早期发育。另外,有研究显示:共培养体系中的体细胞有帮助胚胎越过发育阻滞的作用^[13],而发育阻滞又普遍存在于哺乳动物的早期胚胎发育中^[14]。Vero 细胞分泌 PDGF 或清除培养基中的毒素都有可能帮助胚胎越过发育阻滞^[15]。有研究证实:Vero 细胞可分泌 EGF。Lee

等的研究表明:EGFr 受体出现在 2-细胞,桑椹胚,囊胚阶段^[16]。提示:Vero 细胞共滋养有可能促进胚胎的后期发育。目前,对人类、牛、羊等物种的 Vero 细胞共培养体系研究表明:Vero 细胞在一定程度上可促进胚胎的体外发育。而国内外尚未见有 Vero 细胞对猪胚胎早期发育影响的报道。本研究的结果表明:Vero 细胞共培养体系可使猪孤雌胚和核移植胚的囊胚率得到显著提高;而卵裂率和囊胚细胞数与对照组无显著差异。这说明:Vero 细胞有利于早期孤雌囊胚和核移植囊胚的形成;而囊胚细胞数与对照组无显著差异又说明 Vero 细胞虽能提高囊胚形成率,但并不能提高囊胚的质量,即 Vero 细胞共培养体系只能降低囊胚形成的门槛,而不能从根本上改善囊胚的质量。尽管很多报道都表明:共培养体系中的 Vero 细胞对人类和多种哺乳动物的胚胎发育有促进作用;然而,Vero 细胞发挥作用的确切机理仍不清楚,共培养过程中 Vero 细胞促进胚胎发育的分子机理还有待进一步研究。

4 结 论

本研究的结果表明,共培养体系中的 Vero 细胞能促进猪孤雌囊胚及核移植囊胚的形成,对猪早期胚胎的发育有促进作用;但用 Vero 细胞作滋养层的共培养体系不能增加猪孤雌囊胚及核移植囊胚的细胞数。

参考文献:

- [1] ALLEN R L, WRIGHT R W. *In vitro* development of porcine embryos in coculture with endometrial cell monolayers or culture supernatants[J]. *J Anim Sci*, 1984, 59(6):1657-1661.
- [2] KUZAN F B, WRIGHT R W. Blastocyst expansion, hatching, and attachment of porcine embryos cocultured with bovine fibroblasts *in vitro*[J]. *Animal Reproduction Science*, 1982, 5(1): 57-63.
- [3] REED M, ILLERA M, PETTERS R. *In vitro* culture of pig embryos[J]. *Theriogenology*, 1985, 37(1): 95-109.
- [4] MENEZO Y J, GUERIN J F, CZYBA J C. Improvement of human early embryo development *in vitro* by co-culture on monolayer of Vero [J]. *Cells Biol Reprod*, 1990, 42(2): 301-306.
- [5] DESAI N, GOLDFARB J. Co-cultured human embryos may be subjected to widely different microenvironments: pattern of growth factor/cytokine release by Vero cells during the co-culture interval[J]. *Human Reproduction*, 1998, 13(6):1600-1605.
- [6] KIM Y B, AHN S H, CHANG D Y, et al. Vero cell co-culture counteracts the detrimental effects of hydrosalpinx fluid on the development of mouse embryos *in vitro*[J]. *Journal of Korean Medical Science*, 2002,17(2):217-219.
- [7] MOULAVI F, HOSSEINI S M, ASHTIANI S K, et al. Can Vero cell co-culture improve *in-vitro* maturation of bovine oocytes? [J]. *Reproductive BioMedicine*, 2006,13(3):404-411.
- [8] LIU L, SHIN T, PRYOR J H, et al. Regenerated bovine fetal fibroblasts support high blastocyst development following nuclear transfer [J]. *Cloning*, 2001,3(2):51-58.
- [9] 冯 冲,周艳荣,龙 川,等.体细胞核移植生产转 ω -3脂肪酸去饱和酶基因(sFat-1)的猪胚胎[J]. *畜牧兽医学报*, 2009,40(5):633-638.
- [10] 潘登科,刘 吉,冯书堂,等.氧分压、培养基及生长因子对猪体细胞克隆胚胎体外发育的影响[J]. *中国农业科学*, 2008,41(4): 1186-1191.
- [11] TURNER K, LENTON E A. The influence of Vero cell culture on human embryo development and chorionic gonadotrophin production *in vitro* [J]. *Human Reproduction*, 1996,11(9):1966-1974.
- [12] LYS DAHL H, GABRIELSEN A, MINGER S L, et al. Derivation and characterization of four new human embryonic stem cell lines: the Danish experience [J]. *Reproductive BioMedicine Online*, 2006,12(1):119-126.
- [13] CHEN H F, HO H N, CHEN S U, et al. Peptides extracted from Vero cell cultures overcomes the blastocyst block of mouse embryos in a serum-free medium [J]. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 1994,11(3):165-171.
- [14] BAVISTER B D. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts [J]. *Human Reproduction*, 1995, 1(2): 91-148.
- [15] SCHILLACI R, CIRIMINNA R, CEFALU E. Vero cell effect on *in-vitro* human blastocyst development: preliminary results[J]. *Human Reproduction*, 1994, 9(6): 1131-1135.
- [16] LEE G S, KIM H S, HYUN S H, et al. Effect of epidermal growth factor in preimplantation development of porcine cloned embryos [J]. *Mol Reprod Dev*, 2005, 71(1):45-51.

(编辑 郭云雁)