

小鼠孤雌生殖的胚胎干细胞的初步研究

陈林君¹, 刘丽娟¹, 李红霞², 王晓琳¹, 沈维干^{1,3}, 李朝军¹

(1. 南京师范大学生命科学学院江苏省分子医学生物技术重点实验室, 江苏 南京 210097)

(2. 南京市妇幼保健院生殖中心, 江苏 南京 210004)

(3. 扬州大学医学院, 江苏 扬州 225001)

[摘要] 比较去透明带孤雌桑葚胚和留透明带孤雌囊胚、体内受精胚胎、体外受精胚胎在饲养层上囊胚的扩张率、贴壁生长率。结果表明去透明带孤雌桑葚胚比留透明带孤雌囊胚的扩张率显著($p < 0.05$)提高, 而贴壁率则极其显著地($p < 0.01$)提高, 此外前者还发生增殖。但孤雌胚胎的囊胚扩张率、贴壁率和增殖率均极其显著地($p < 0.01$)低于体内受精胚胎和体外受精组; 体内受精胚胎的体外发育最佳。说明去透明带孤雌桑葚胚比留透明带孤雌囊胚更利于在饲养层上贴壁生长, 为建立孤雌生殖的胚胎干细胞系提供了基础。

[关键词] 体内受精, 体外受精, 孤雌生殖, 卵母细胞, 原代小鼠成纤维细胞

[中图分类号] R966 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2006)01-0071-04

A Primary Study of Mouse Parthenogenetic Stem Cell

Chen Linjun¹, Liu Lijuan¹, Li Hongxia², Wang Xiaolin¹, Shen Weigan^{1,3}, Li Chaojun¹

(1. Jiangsu Key Laboratory for Molecular and Medical Biotechnology, School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

(2. IVF Center of Nanjing Maternity and Children and Health Hospital, Nanjing 210004, China)

(3. Medical College of Yangzhou University, Yangzhou 225001, China)

Abstract: The parthenogenetic morulas with or without zona pellucida are placed onto the feeder layers of PMEFs. The morulas from in vivo fertilization and in vitro fertilization are also cultured under the same condition. Then the rates of expanding and attachment of blastocysts are compared. The rate of expanding from the parthenogenetic morulas without zona pellucida is significantly ($p < 0.05$) higher than that of the parthenogenetic blastocysts with intact zona pellucida. The rate of attachment of the former is significantly ($p < 0.01$) higher than that of the latter, and moreover, the former has proliferation capability. The rates of expanding, hatching, attachment and proliferation from the parthenogenetic embryos are significantly ($p < 0.01$) lower than those of the other two groups. The embryos from the in vivo fertilization develop best. Therefore, the parthenogenetic morulas without zona pellucida are more capable of attaching onto the feeder layers of PMEFs than the parthenogenetic blastocysts with intact zona pellucida.

Key words: in vivo fertilization, in vitro fertilization, parthenogenesis, oocyte, primary mouse embryo fibroblasts

0 引言

胚胎干细胞(Embryonic stem cell)也称ES细胞,是从着床前的囊胚的内细胞在体外扩增,并进行传代培养而得到的一种细胞,具有未分化性和多潜能性两大特点。由于ES细胞具有多潜能性,可以分化发育成不同组织产生不同的功能细胞,故广泛用于胚胎发育及胚胎工程方面的研究^[1]。最近有文献报道^[2,3],孤雌生殖的胚胎干细胞也同样具有未分化性和多潜能性,这样一来,如果可以通过体外激活人卵母细胞来建立孤雌生殖胚胎干细胞系,就可以适当减少因利用人类受精胚胎来建立胚胎干细胞所导致的宗教、道

收稿日期: 2005-03-02.

基金项目: 南京市科学技术局资助项目(200301105)。

作者简介: 陈林君, 1979—, 硕士研究生, 主要从事小鼠卵母细胞孤雌激活的学习与研究。E-mail: linjunchen@sohu.com

通讯联系人: 李朝军, 1966—, 教授, 博士生导师, 主要从事细胞生物学的教学与研究。E-mail: lij@njnu.edu.cn

德、伦理上的争议. 本实验通过体外激活小鼠卵母细胞, 将激活后的卵母细胞在体外培养至桑葚胚或囊胚, 然后将这些胚胎移至饲养层上进一步培养, 结果发现去透明带的孤雌桑葚胚更易在饲养层上贴壁并增殖, 这样为其他动物和人卵母细胞来源的孤雌生殖的胚胎干细胞的有关研究提供参考.

1 材料和方法

1.1 实验材料

昆明系小鼠(体重22 g)购自南京中医药大学, 雌鼠群养, 雄鼠单笼饲养, 适应养殖3 d, 光照时间(白天8:00~20:00, 黑夜20:00~8:00), 饲养普通饲料(南京浦口饲料厂), 自由饮水.

1.2 实验方法

1.2.1 卵母细胞的孤雌激活

卵母细胞的体外激活方法参考文献^[4]. 孤雌胚胎发育至8-cell时换用CZB+G培养, 24 h换液并观察实验结果. 发育至桑葚胚的胚胎用酸性Tyrode's液^[5]去除透明带.

1.2.2 体内受精

在注射hCG后立即将雌雄小鼠合笼过夜(雌:雄=1:1), 次日上午8:00时检查阴道栓, 有阴道栓者记为怀孕0.5 d, 在怀孕第3.5 d从子宫冲取胚胎, 将取出的胚胎培养在经丝裂霉素C处理过的原代小鼠胚胎成纤维细胞的饲养层上.

1.2.3 体外受精

参考吴红等文献^[6].

1.2.4 统计分析方法

以上实验均重复3次, 所有数据用SPSS11.0统计软件包分析, 以 $p < 0.05$ 为显著性差异, $p < 0.01$ 为极显著差异. 表1括号中数据均是本组数据占对应的桑葚胚数或囊胚数的百分数.

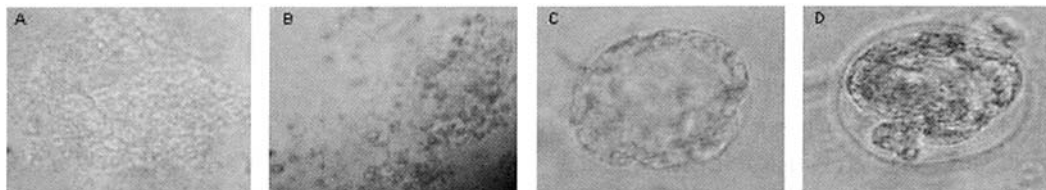
2 结果

2.1 孤雌胚胎的发育

卵母细胞经10%的乙醇在37℃, 5% CO₂条件下处理5 min, 5~6 h后卵母细胞将出现原核或卵裂, 则认为卵细胞已被激活, 激活的类型有四种^[7]. 本实验研究的结果发现卵母细胞经激活后主要出现单原核或发生卵裂(速急卵裂)两种类型, 且发生速急卵裂的胚胎具有更大的发育潜能, 所以本实验采用的孤雌桑葚胚均由速急卵裂的胚胎发育而来.

2.1.1 孤雌囊胚的孵化与贴壁生长

孤雌囊胚的孵化率和贴壁率非常之低, 只有7.7%, 与体内受精和体外受精相比, 极其显著地($p < 0.01$)降低(表1), 孤雌囊胚在体外培养的第5天开始孵化贴壁, 第6天就开始分化, 分化的速度是相当快(图1. A~B). 但大多数地孤雌囊胚不能孵化, 培养一段时间后囊胚的胞质就会收缩(图1. C~D), 最终胚胎死亡.



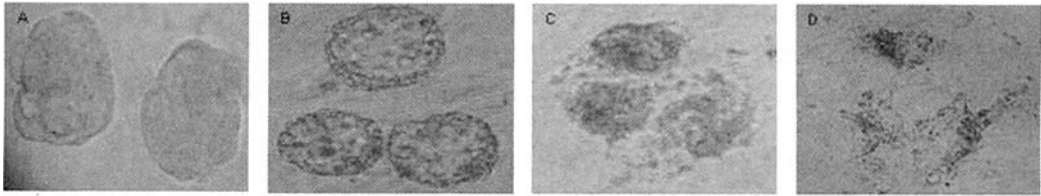
A: 体外培养第5天, 孤雌囊胚孵化后的贴壁生长, 200x; B: 体外培养第6天, 贴壁生长后的分化, 400x; C~D: 饲养层上未能孵化的孤雌囊胚; C: 体外培养第4天, 囊胚, 400x; D: 体外培养第5天, 未能孵化的囊胚, 胞质开始收缩, 400x

图1 A~D 孤雌囊胚孵化和未孵化后在饲养层上的贴壁生长

2.1.2 孤雌桑葚胚去透明带后的发育与贴壁生长

由于孤雌囊胚的孵化率和贴壁率非常之低, 且绝大多数都不能孵化. 所以本实验就用酸性Tyrode's液将发育至桑葚胚胚胎的透明带去掉, 然后移至饲养层上培养. 结果发现孤雌桑葚胚在去掉透明带后具有

更大的发育潜能,其囊胚的发育率与留透明带囊胚的发育率差异不显著(36.1% vs38.5%, $p > 0.05$),而扩张率显著地(27.8% vs23.1%, $p < 0.05$)高于后者,贴壁率极其显著地(16.7% vs7.7%, $p < 0.01$)高于后者;但扩张率、贴壁率、增殖率均极其显著地(表1.)低于体内受精、体外受精组。去透明带桑葚胚在体外培养的第5天就发育至囊胚,第6天就开始增殖,但增殖的程度没有体内受精、体外受精组的明显,且到第8天内细胞团的绝大多数均已分化(图2. A~D)。

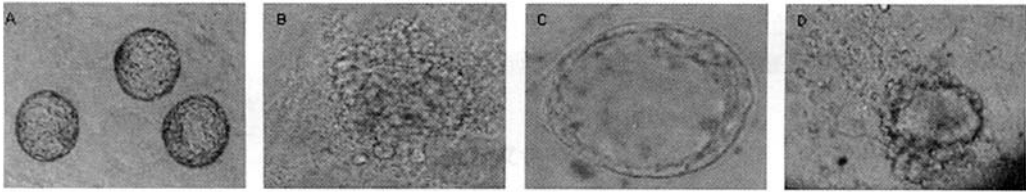


A:体外培养第3天,去透明带的桑葚胚,400 \times ; B:体外培养第5天,囊胚,200 \times ; C:体外培养第6天,内细胞团贴壁生长200 \times ; D:体外培养第8天,内细胞团四周大部分已分化,100 \times

图2 A~D 去透明带孤雌桑葚胚在饲养层上的贴壁生长

2.2 体内受精胚胎的孵化与贴壁生长

来自内受精3.5 d的胚胎24 h后开始孵化。体外培养的第3 d内细胞团开始增殖,到第8 d时内细胞团周围已有好多分化的细胞,其特征是内细胞团集落周围不平滑,而是有细胞长出(见图3. A~B)。



A:体外培养第2天,囊胚完全孵化,200 \times ; B:体外培养第8天,内细胞团四周开始分化,400 \times ; C~D:体外受精胚胎在饲养层上的贴壁生长; C:体外培养第5天,囊胚开始孵化,400 \times ; D:体外培养第8天,内细胞团四周开始分化,400 \times

图3 A~D 体内外受精胚胎在饲养层上的贴壁生长

2.3 体外受精胚胎的孵化与贴壁生长

来源于体外受精的胚胎在体外培养的第5天开始孵化,第6天内细胞团开始增殖,第8天内细胞团四周已有许多分化的细胞(见图3. C~D)。与体内受精相比,体外受精的囊胚的扩张率、孵化率、贴壁率和增殖率均极其显著地($p < 0.01$)低于体内受精组(见表1)。

表1 有无透明带孤雌胚胎、体内受精、体外受精胚胎在饲养层上的生长

组别	桑葚胚数	囊胚数%	扩张数%	孵化数%	贴壁数%	增殖数%
孤雌胚胎(留透明带)	13	5(38.5%) ^a	3(23.1%) ^a	1(7.7%) ^a	1(7.7%) ^a	—
孤雌胚胎(去透明带)	36	13(36.1%) ^a	10(27.8%) ^b	—	6(16.7%) ^f	3(8.3%) ^f
体内受精	—	72	62(86.1%) ^c	62(86.1%) ^c	62(86.1%) ^c	56(77.8%) ^e
体外受精	11	11	7(63.6%) ^d	6(54.5%) ^e	5(45.5%) ^e	5(45.5%) ^e

(a: b = $p < 0.05$, a: c = a: d = a: e = a: f = b: c = b: d = c: d = c: e = c: f = e: f = p , $p < 0.01$)

3 讨论

小鼠卵母细胞经体外激活可以发育至囊胚,本实验研究发现速急卵裂的胚胎具有更大的发育潜能,与刘红林等^[7]的研究结果一致。而孤雌囊胚的孵化率极低,只有7.7%,从而导致贴壁率低,可能与胚胎长时间在体外培养而不易穿破透明带有关。同时去透明带孤雌桑葚胚的贴壁率也只有16.7%,可能由于用酸性Tyrode's液处理透明带时胚胎受到影响,从而影响囊胚的形成和其贴壁率。

哺乳动物的卵母细胞外面有透明带包裹,一方面可以维持早期胚胎三维结构的完整性,另一方面对于胚胎细胞而言,完整的透明带是一道天然的保护屏障,免于遭受体内外有害因素的侵袭,诸如细菌、病毒、毒素乃至免疫细胞等^[8]。但是,到囊胚扩张的后期,胚胎必须“脱壳”而出,否则胞质就会收缩,最终不能着

床而死亡,许多胚胎不能顺利着床而往后进一步发育,其中重要的一个原因就是囊胚不能正常孵化.受精后透明带自然变硬,随着第一次受精卵分裂的开始,在胚胎内部压力和透明带分泌的溶解素的作用下,透明带开始变薄直至破裂,随之囊胚孵出.在体外培养过程中,培养时间延长,培养基不合适,例如缺乏某些必需的氨基酸或生长因子,可导致胚胎活力下降,表现为胚胎的发育速度较慢,胚胎溶解素分泌不足会减弱透明带溶解薄化,最终造成胚胎孵出困难^[9,10].同样,本实验中体外受精囊胚的孵化率极其显著地低于体内受精组,可能也是由于体外受精的胚胎在体外培养的时间长,胚胎溶解素分泌少而减弱透明带的薄化有关,贴壁率和增殖率也随之降低.林戈等^[11]研究发现体外培养囊胚与体内发育囊胚的自然孵化率分别为75.4%和96.2%,也存在显著差异.因此,可以在体外培养的体系中添加一些成分,如生长因子等以便促进体外培养胚胎的发育.

本实验研究发现去透明带孤雌桑葚胚在体外培养可以发育至囊胚,且发育率为36.1%,与留透明带孤雌桑葚胚的囊胚的发育率(38.5%)无显著差异,但囊胚扩张率、贴壁率均显著提高(表1),但是均极其显著地低于体内受精、体外受精组.造成这一结果的原因除了与体外培养体系和时间过长有关外;另一个原因可能与基因调控有关.

而本实验研究发现将发育至桑葚胚期的孤雌胚胎的透明带去除,其囊胚的扩张率、贴壁率较留透明带孤雌囊胚的要显著升高(27.8% vs 23.1%, $p < 0.05$; 16.7% vs 7.7%, $p < 0.01$)外,且有少部分(8.1%)发生增殖,而内细胞团增殖是建立胚胎干细胞所必需的.此外,本实验中发现内细胞团很容易分化,可以向培养基中添加白血病抑制因子(LIF)用来抑制其分化,并在适当时候离散内细胞团^[3,12].因此在桑葚胚期就去掉透明带,更有利于孤雌胚胎的贴壁生长和增殖,为建立孤雌胚胎干细胞系提供了基础,从而为其他动物和人卵母细胞来源的孤雌生殖的胚胎干细胞的有关研究提供参考.

[参考文献]

- [1] 黄冰,黄文革,钟女奇,等.小鼠胚胎干细胞在六种培养体系的培养观察[J].中国实验动物学报,2000,8(1):1—6.
- [2] Cibelli J B, Grant K A, Chapman K B, et al. Parthenogenetic stem cells in nonhuman primates[J]. Science, 2002, 295(5556):819.
- [3] Lin H, Lei J, Wining D, et al. Multilineage potential of homozygous stem cells derived from metaphase II oocytes[J]. Stem Cells, 2003, 21(2):152—161.
- [4] 刘红林,范必勤,陈宜峰.小鼠卵母细胞的乙醇激活[J].南京农业大学学报,1996,19(4):56—60.
- [5] Andras Nagy, Marina Gertsenstein, Kristina Vintersten, et al. Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003.
- [6] 吴红,孙强,范士明,等.不同品系小鼠体外受精方法的研究[J].扬州大学学报:农业与生命科学版,2004,25(1):18—21.
- [7] 刘红林,汪河海,范必勤,等.乙醇激活诱导小鼠孤雌胚的发育与核型分析[J].畜牧与兽医,2000,32(1):7—8.
- [8] 李国善,邵敬於.人类胚胎辅助孵化技术和应用概况[J].生殖与避孕,1996,16(6):408—412.
- [9] 徐瑜,孙莹璞.辅助孵化在IVF-ET中的应用进展[J].国外医学:计划生育分册,2003,22(1):34—36.
- [10] Hsieh Y Y, Tsai H D, Chang F C. Routine blastocyst culture and transfer: 201 patients' experience[J]. J Assist Reprod Genet, 2000, 17(8):405—408.
- [11] 林戈,卢光琇.小鼠体外培养囊胚辅助孵化的初步研究[J].生殖与避孕,2001,21(4):206—209.
- [12] 都同功,陈系古,刘兰英,等.小鼠胚胎干细胞的培养[J].中国实验动物学报,1999,7(1):26—30.

[责任编辑:孙德泉]