

几种培养液对昆白系小鼠早期胚胎体外发育的影响^{*}

刘淑娟, 华进联, 葛秀国, 严兴荣, 胡勇策, 窦忠英^{*}

(西北农林科技大学, 国家干细胞工程技术研究中心陕西分中心, 陕西杨凌 712100)

摘要: 为了完善小鼠早期胚胎体外培养体系, 探讨以 KSOM 为基础液添加新生牛血清(NBS)、胎牛血清(FBS) 及 BSA 和 G1/G2 对小鼠早期胚胎体外发育的影响。结果表明: ①添加 10%NBS 的 KSOM 组和 G1/G2 培养液组的囊胚率分别为 89.52% 和 87.08%, 二者差异不显著; ②添加 10%FBS 组囊胚率为 10.26%, 与 ①中两组差异极显著; ③添加 0.1%BSA 和 0.4%BSA 组囊胚率为 0%, 与其他三组差异极显著。添加新生牛血清的 KSOM 与胚胎培养液 G1/G2 均有效克服昆白小鼠 2-细胞阻滞, 并能得到较高的囊胚率。

关键词: 胚胎培养; 细胞阻滞; KSOM; G1/G2

中图分类号: S852.1

文献标识码: A

文章编号: 1004-1389(2007)03-0019-04

Effects of Several Media on the Early Embryonic Development of KM Strain Mouse in Vitro

LIU Shu-juan, HUA Jin-lian, GE Xiu-guo, YAN Xing-rong,
HU Yong-ce and DOU Zhong-ying^{*}

(Northwest A & F University, Shaanxi Branch of National Stem Cells Engineering & Technology, Yangling Shaanxi 712100, China)

Abstract: KSOM was used as a base medium. In order to improve the system for mouse embryo culture, the effects of adding newborn bovine serum(NBS), fetal bovine serum(FBS), bovine serum albumin(BSA) to KSOM respectively and G1/G2 medium on early mouse embryo development were studied. The result were as follows: ① The G1/G2 medium and KSOM containing 10% NBS could support mouse embryo development to blastocysts in 89.52% and 87.08% respectively. There were no differences between the two groups. ② The blastocysts rate of KSOM with 10%FBS was 10.26%, significantly lower than group G1/G2 and KSOM containing 10%NBS. ③ The rates of blastocysts of the two groups containing 0.4%BSA and 0.1%BSA were zero, significantly lower than other three groups. The KSOM medium with 10% NBS and medium G1/G2 were effective to overcome the 2-cell block, and the blastocysts rate of the two groups were high.

Key words: Embryo culture; Cell block; KSOM; G1/G2

哺乳动物早期胚胎存在着发育阻滞 (cell block) 的现象, 如小鼠胚胎发生在 2 细胞期、牛胚胎发育阻滞发生在 8~16 细胞时期、人胚胎发生在 8 细胞期、猪胚胎发生在 4 细胞时期。小鼠胚胎培养液有多种如, M16、M₂、CZB 及在它们基础上改良的培养液等。KSOM 是小鼠胚胎培养液

中的一种。Lawitts 和 Biggers^[1]首次使用了 SOM(Simplex Optimized Medium), 后来他们又将 SOM 液中 NaCl 和 KCl 的浓度由原来的 85mmol/L 和 0.25mmol/L 分别提高到 95mmol/L 和 2.5mmol/L, 得到改良液即 KSOM^[2]。小鼠早期胚胎培养的关键在于如何克服 2-细胞阻滞。

^{*} 收稿日期: 2006-09-01 修回日期: 2006-12-08

基金项目: 教育部重大科研专项(05100)。

作者简介: 刘淑娟 (1980-), 女, 河南周口人, 在读硕士, 主要从事哺乳动物胚胎工程研究。E-mail: liushujuan1129@163.com

^{*} 通讯作者: 窦忠英 (1939-), 男, 陕西兴平人, 教授, 博士生导师, 主要从事哺乳动物胚胎工程和干细胞工程研究。

克服小鼠胚胎发育阻滞的培养液添加成分很多,如必需和非必需氨基酸、牛磺酸等。王敏康等^[3]除去 M16 和 CZB 中的葡萄糖和磷酸盐并添加果糖、牛磺酸、EDTA、谷氨酰胺、必需和非必需氨基酸,囊胚率分别为 85%、68%。黄吴键等^[4]在 KSOM 基础上仅添加 0.1% 和 0.4% BSA 用来培养昆白小鼠 1-细胞胚胎,囊胚率分别达到了 73.5% 和 75.5%,同样条件下,刘忠华等^[5]得到囊胚率为 9.5% 的。综上所述,小鼠胚胎培养尤其是 2-细胞的克服,仍然存在一定的不稳定因素,不同实验室实验结果差别很大。本实验在前人的基础上添加血清及 BSA 进行比较,目的在于探索适合自己的培养体系,同时也为小鼠胚胎培养体系的进一步完善提供一些参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

实验动物 为昆明系性成熟小鼠,购自第四军医大学实验动物中心。12~14 h 光照,室内温度为 21~26℃,自由饮水采食。

主要试剂 孕马血清促性腺激素(PMSG)

和人绒毛膜促性腺激素(hCG)购自宁波激素制品厂,丙酮酸钠为德国 SERVA 公司产品,胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS)和谷氨酰胺均购自 GIBIC 公司,新生牛血清(Newborn Bovine Serum, NBS)采自本实验室试验牛场,其余试剂均购自 Sigma 公司。胚胎冲洗液 mPBS 是在 PBS 液基础上改进后自配,G1/G2(人类胚胎培养液)为瑞士 Vitrolife 公司产品,胚胎培养液(KSOM)参考 Summers 等^[6]的配制方法配制(表 1)。

1.2 方 法

1.2.1 实验动物处理 选取 6~8 周龄、体重 25~40 g,发情期间期^[7]雌性小鼠。18:00 腹腔注射 PMSG (8IU/只),间隔 48~50 h 腹腔注射 hCG(8IU/只)。注射 hCG 后将雌鼠与雄鼠按 1:1 合笼,让其自然交配。合笼第二天早晨检查是否有阴道栓。注射 hCG 后 17~19 h,颈椎脱臼处死见栓母鼠,打开腹腔取出双侧子宫、输卵管及卵巢。剪去卵巢和子宫,用 mPBS 冲洗掉血液,在 mPBS 中剥开输卵管壶腹部,挤出卵丘-卵母细胞团,即得到早期 1-细胞胚胎^[8]。

表 1 几种培养液组成成分
Table 1 Components of several media

成分 Components	分子量 Molecular weight	培养液 Media / (mg · L ⁻¹)					
		KSOM _{NBS} Group 1	KSOM _{FBS} Group 2	KSOM _{BSA} Group 3	mPBS Group 4	G1 Group 5	G2
NaCl	58.45	5592.70	5592.7	5592.70	800.00	4976.80	4976.80
KCl	74.55	185.13	185.13	185.13	200.00	410.00	410.00
KH ₂ PO ₄	136.09	47.63	47.63	47.63	200.00	—	—
Na ₂ HPO ₄	141.96	—	—	—	1150.00	—	—
NaH ₂ PO ₄	120.00	—	—	—	—	60.00	60.00
MgSO ₄ · 7H ₂ O	246.47	49.30	49.30	49.30	—	—	—
MgCl ₂ · 6H ₂ O	203.30	—	—	—	100.00	203.30	203.30
NaHCO ₃	84.01	2100.25	2100.25	2100.25	2100.30	2100.30	—
CaCl ₂	110.99	186.90	186.90	186.90	100.00	199.80	199.80
乳酸钠(60%) Sodium lactate	12.10	1970.00	1970.00	1970.00	—	1176.60	657.80
丙酮酸钠 Sodium Pyruvate	10.00	22.01	22.01	22.01	36.00	35.20	11.00
葡萄糖 Glucose	180.16	6.03	6.03	6.03	1000.00	—	—
蔗糖 Sucrose	198.17	—	—	—	—	99.10	624.20
EDTA(二钠盐)	336.21	—	3.36	3.36	3.36	—	3.36
人血清白蛋白 HAS	—	—	—	—	—	2000.00	2000.00
牛血清白蛋白 BSA	—	—	4000/1000 &	—	—	—	—
新生牛血清 NBS	—	10% (v/v)	—	—	—	—	—
胎牛血清 FBS	—	—	10% (v/v)	—	—	—	—
青霉素 Penicillin	—	60.00	60.00	60.00	70.00	—	—
链霉素 Streptomycin	—	50.00	50.00	50.00	50.00	—	—
酚红 Phenol Red	—	10.00	10.00	10.00	—	—	—

注:BSA 含量为 0.4% 时添加量为 4 000 mg/L,BSA 含量为 0.1% 时添加量为 1 000 mg/L。

Note: 4 000 mg/L and 1 000 mg/L BSA will be added respectively when the concentration of BSA is 0.4% and 0.1%.

1.2.2 胚胎培养 将剥离出的胚胎随机分成以下5组,同时培养。组一:在KSOM的基础上添加10%NBS;组二:在KSOM基础上添加10%FBS;组三:在KSOM基础上0.4%BSA;组四:在KSOM基础上添加0.1%BSA;组五:1-细胞胚胎在G1中培养到2-细胞期,然后移入G2中继续培养。

以上5组所用胚胎培养液,在35 mm培养皿(NUNCLON公司)上制成20 μ L/滴的微滴,上覆盖石蜡油,培养前在5%CO₂、95%空气、饱和湿度的培养箱中平衡4 h以上。每滴培养10枚左右未脱颗粒细胞胚胎。每隔24 h左右观察并记录胚胎发育情况。

1.3 数据处理

每组实验至少重复3次,实验所得数据均经百分数t检验进行统计处理。

2 结果与分析

结果(表2)表明,组一、组二、组五均起到克服小鼠胚胎2-细胞阻滞的作用(图1~3)。其中组一和组五较组二的效果好,且囊胚率高(图4),差异极显著($P < 0.01$);但组一和组五间差异不显著($P > 0.05$)。组三和组四中只有少数胚胎突破2-细胞阻滞,且无达到桑椹胚和囊胚囊阶段的胚胎。

表2 几种培养液及添加成分对昆白小鼠胚胎发育的影响

Table 2 Effects of several culture media with different additives on the development of KM mouse embryos

分组 The groups	胚胎数 No. of embryos	胚胎发育阶段 Stage of development				
		2-细胞胚胎 2-cell	4-细胞胚胎 4-cell	8-细胞胚胎 8-cell	桑椹胚 Morula	囊胚 Blastocyst
组一 Group 1	124	118 (95.16) a	118 (95.16) A	117 (94.35) A	113 (91.13) A	111 (89.52) A
组二 Group 2	39	33 (84.62) b	17 (43.59) B	11 (28.20) B	6 (15.39) B	4 (10.26) B
组三 Group 3	57	50 (87.72) ab	6 (10.52) C	0	0	0
组四 Group 4	96	85 (88.54) ab	9 (9.38) C	1 (1.04) C	0	0
组五 Group 5	78	75 (96.15) a	73 (93.59) A	69 (88.46) A	68 (87.08) A	68 (87.08) A

注:同一列各组之间小写字母完全不同者表示 $P < 0.05$;同一列各组之间大写字母完全不同者表示 $P < 0.01$;同一列各组之间含有相同字母者表示差异不显著。

Note: Letters labeled above the means denote, if the small letters of the same row are totally different, significant difference ($P < 0.05$); if the capital letters of the same row are totally different, significant difference ($P < 0.01$); if the letters of the same row are not totally different, no significant difference.

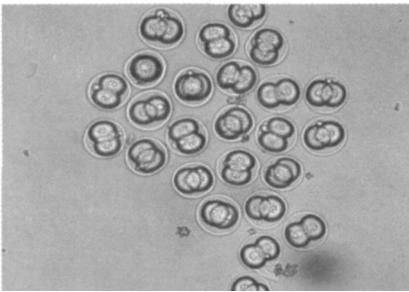


图1 组一中培养的2-细胞期胚胎(10×10)

Fig. 1 2-cell embryos cultured of group 1

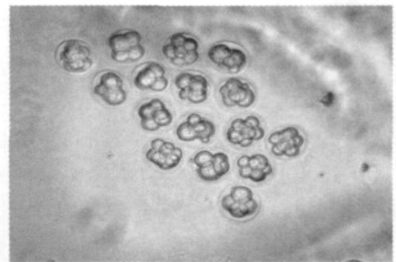


图3 组二中培养的8-细胞胚胎(10×10)

Fig. 3 8-cell embryos cultured of group 2

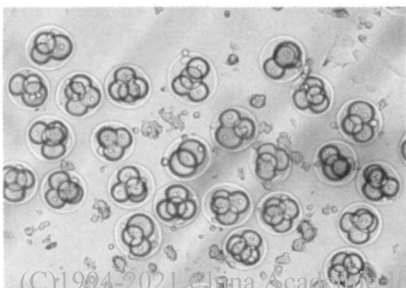


图2 组五中培养的3~4-细胞期的胚胎(10×10)

Fig. 2 3~4-cell embryos cultured of group 5

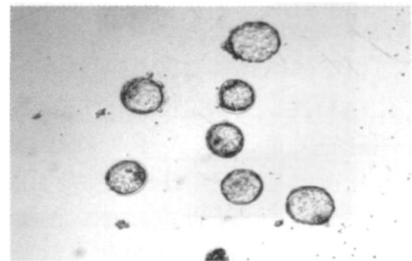


图4 组五中培养的囊胚(10×100)

Fig. 4 Blastocysts cultured of group 5

3 讨论

实验结果表明:组一和组五培养液培养小鼠早期 1-细胞胚胎得到较高囊胚率,分析具体原因可能有以下三点:①葡萄糖和磷酸盐可以导致仓鼠胚胎发生 2-细胞阻滞^[9],并且抑制 8-细胞胚胎的继续发育^[10]。Chatot 等^[11]研究发现,在不含葡萄糖的 CZB 中培养 CF-1×B6SJL F1/J1 1-细胞胚胎,有 83%突破 2-细胞阻滞,48 h 后添加葡萄糖可使囊胚率达到 48%,培养液中一直不添加葡萄糖时胚胎不能发育到囊胚期。KSOM 中葡萄糖浓度较低,仅为 0.2 mmol/L, G1/G2 中含有蔗糖而不含葡萄糖,且磷酸盐浓度也很低。另外,颗粒细胞生长时可以利用葡萄糖和磷酸盐,从而进一步降低了培养液中二者的浓度。②颗粒细胞生长过程中分泌的一些因子可以促进胚胎发育。在实验中发现,添加 BSA 组贴壁的颗粒细胞数量远远少于其他组,且形态不正常。颗粒细胞生长时可以分泌多种利于胚胎发育的因子和其他成分,颗粒细胞生长不良可能是导致组三、组四胚胎发育率低的又一个重要原因。钱云等^[12]发现颗粒细胞与猪胚胎共培养时 4-细胞发育率为 24.0%,对照组发育率为 0。张志平等^[13]将体外受精后的牛胚胎与颗粒细胞共培养,囊胚率达到了 44.9%。但也有人持不同观点,如李光鹏等^[14]的研究发现,卵丘细胞对昆白小鼠胚胎克服发育阻滞无明显作用。③本实验中用血清代替 KSOM 中 BSA 的培养胚胎,取得了较好的效果。胚胎在体内发育时受到多种因子的作用,例如, Rosenblum 等^[15]研究发现,8-细胞期小鼠胚胎的细胞膜上开始出现胰岛素受体。此受体可以与胰岛素(母源因子)相结合影响胚胎发育^[16]。血清中含有多种细胞因子,这些因子对胚胎发育起到有利作用,所以添加血清更接近体内胚胎发育的环境。前人研究发现,胚胎和细胞培养液中添加 FBS 其培养效果要比添加 NBS 好,但是本实验中却得到相反的结果。其原因可能是不同批次的血清具有差异性。另外,胚胎培养效果与血清浓度也有一定的关系,安志兴等^[17]在牛体外受精胚胎培养时分别添加 10%NBS 和 5%NBS,分别得到 24.12% 和 20.43% 的囊胚率,二者差异显著。本实验结果表明添加血清组的囊胚率显著高于添加 BSA 组,但是 Summers 等^[18]在 KSOM 中添加 0.1% 或 0.4% 的 BSA 培养 CF1×

B6D2F1 杂交早期胚胎,囊胚率分别达到了 96.9% 和 96.4%,这可能由于不同种属小鼠胚胎之间存在差异性。

在实验中观察到组一和组二中培养的胚胎,胞质较暗可见大量的暗色的颗粒状物质,Rebecca 等^[18]认为这是由于添加血清造成的。组一和组二中的胚胎发育较组五中迟 12h 左右,组五中培养的胚胎胞质透亮和体内正常发育的胚胎相似,发育速度也和体内发育胚胎一致。由于组五培养液价格昂贵,致使其使用范围受到限制,目前主要用于人胚胎培养。本实验显示,组一是较为理想的昆白小鼠早期胚胎培养液。

参考文献:

[1] Lawitts J A, Biggers J D. Optimization of mouse embryo culture media using simplex methods [J]. *Reprod Fertil*, 1991, 91:543.

[2] Erbach G B, Lawitts J A, Biggers J D, et al. Differential Growth of the Mouse Preimplantation Embryo in Chemically Defined Media [J]. *Biology of reproduction*, 1994, 50: 1027~1033.

[3] 王敏康,张田,王晓燕.几种克服昆明小鼠 2-细胞胚胎发育阻滞的培养液研究[J]. *动物学报*, 2000, 46(1): 81~87.

[4] 黄吴键,袁进,邓星,等. KSOM 培养基营养成分调整对小鼠植入前期胚胎体外发育的影响[J]. *第一军医大学学报*, 2005, 25(3): 256~261.

[5] 刘忠华,谭景和,贺佳馨.小鼠 1-细胞胚胎体外培养条件的研究[J]. *解剖学报*, 1999, 30(4): 376~378.

[6] Summer M C, Bhatnagar P R, Lawitts J A, et al. Fertilization In Vitro of Mouse Ova from Inbred and Outbred Strains: Complete Prerimplantation Embryo Development in Glucose-Supplemented KSOM [J]. *Biology of Reproduction*, 1995, 53: 431~437.

[7] 陈悦洲. 小鼠体外受精及早期胚胎体外培养方法的建立 [D]. 北京: 中国农业大学, 2005.

[8] Brown J J G, Whittingham D G. The roles of pyruvate, lactate and glucose during preimplantation development of embryos from F1 hybrid mice in vitro [J]. *Development*, 1991, 112: 99~105.

[9] Schini S A, Bavister B D. Two-cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose [J]. *Biol Reprod*, 1988, 39: 1183.

[10] Schini S A, Bavister B D. Glucose inhibits development of Hamster 8-cell embryos in vitro [J]. *Biology of reproduction*, 1989, 40: 559~606.

[11] Chatot C L, Ziomek C A, Bavister B D, et al. An improved culture medium supports development of randomly bred 1-cell mouse embryos in vitro [J]. *J Reprod Fertil*, 1989, 86: 679.

3 讨论

本试验采用液相化学还原法制备纳米银,因为不需要较高的温度,粒径可控性比较好。用透射电镜观察纳米粒子的平均粒径,结果显示,所得的产品粒径分布范围均小于 50 nm,且非常均匀,分散性良好。用透射电镜观察纳米粒子,具有可靠性和直观性。

序贯法测定 LD_{50} ,分为限度试验和主试验。限度试验主要用于有资料提示受试物毒性可能较小的情况。纳米银混悬液的急性毒性反应极轻,雏鸡灌胃给药无法准确测得其 LD_{50} 。急性毒性研究发现,纳米银混悬液的最大耐受量为 30 000 mg/kg,按体重计算,相当于临床剂量的 3 000 倍。在此剂量,未观察到雏鸡死亡和其它明显急性毒性反应。提示纳米银的最大耐受量大,较为安全。

稳定性试验发现,在常温常压下放置 90 d 未见聚集,电镜检测分散良好,表明在 90 d 内纳米

银的稳定性良好。采用倍比稀释法测定纳米银的 MIC 和 MBC,以临床较常用的 3 种药物环丙沙星,甲矾霉素,土霉素为对照药物,结果显示纳米银具有很强的杀菌作用,低浓度能够有效杀死致病性大肠埃希菌,金黄色葡萄球菌和链球菌,为临床应用用于奶牛子宫内膜炎提供了依据。

参考文献:

- [1] 彭子飞,汪国忠,张立德,等.用银氨配离子还原法制备纳米银[J].材料研究学报,1997,11(1):104~106.
 - [2] 段春芳,周静芳.银纳米颗粒的制备及表征[J].化学研究,2003,14(3):18~20.
 - [3] Rodriguez Sanchez L, Blanco MC. Electrochemical synthesis of silver nanoparticles[J]. Journal of Physical Chemistry B, 2000,104(41):9683~9688.
 - [4] 祝寿芬.现代毒理学基础[M].北京:中国协和医科大学出版社,2001,12(2):70~76.
 - [5] 何月英,宁玲忠,曾德年.二甲脂和富马酸抗菌药对常见病原菌的作用效果试验[J].湖南畜牧兽医,2005,(2):4~6.
-
- (上接第 22 页)
- [12] 钱云,师蔚群,朱猛进,等.共培养系统的体细胞类型和状态对猪胚胎早期发育的影响[J].中国兽医学报,2002,22(3):299~302.
 - [13] 张志平,张君涛,安志兴,等.牛胚胎体外培养体系的优化[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2006,34(6):7~10.
 - [14] 李光鹏,赖学良,李子义,等.影响小鼠早期胚胎发育的几个重要因素[J].中国兽医学报,1998,18(2):196~198.
 - [15] Mattson B A, Rosenblum I Y, Smith R M, et al. Autoradiographic evidence for insulin and insulin-like growth factor binding to early mouse embryos [J]. Diabetes, 1998, 37: 585.
 - [16] 白照岱,刘凯,祁录军.胰岛素对小鼠早期胚胎体外发育的影响[J].生殖医学杂志,2004,13(5):286~290.
 - [17] 安志兴,李雪峰,郭继彤,等.牛早期胚胎在不同培养液中体外发育比较[J].西北农业学报,2002,11(4):88~91.
 - [18] Summers M C, McGinns L K, Lawitts J A, et al. IVF of mouse ova in a simplex optimized medium supplemented with amino acids [J]. Human Reproduction, 2000, 15(8): 1791~1801.
 - [19] Krisher R L, Lane M, Bavister B D. Developmental Competence and Metabolism of Bovine Embryos Cultured in Semi-Defined and Defined Culture Media [J]. Biology of Reproduction, 1999, 60: 1345~1352.