

- [9] Christiansen, N. O. et al., 1986, *Biochem. Biophys. Acta.*, 885: 170—176.
 [10] Mage, M. G. et al., 1981, *Eur. J. Im-*

- munol.*, 11: 17—23.
 [11] Hadden, J. W. et al., 1988, *Immunol. Today*, 9: 235—239.

EFFECT OF SUPPRESSOR T CELLS POSTTRAUMA ON INTERLEUKIN 2 AND INTERLEUKIN 2 RECEPTOR α GENE EXPRESSION IN ACTIVATED T CELLS

Liang Huaping, Wang Zhengguo, Gen Bo, Tian Fengqun
 (Research Institute of Surgery, Third Military Medical College, Chongqing 630042)

ABSTRACT

Suppressive effect of suppressor T cells (Ts) from traumatized mice on interleukin 2 (IL-2) and IL-2 receptor (IL-2 R) α gene expression was studied. The results showed that the suppressive effect of Ts cells posttrauma on IL-2 mRNA and IL-2 R α mRNA levels of normal activated T cells was enhanced, this effect was most obviously on day 4 and still not returned to normal on day 10 posttrauma. Ts cells posttrauma could elevate cAMP contents of normal activated T cells, decrease cGMP contents, increase the ratio of cAMP to cGMP, reduce inositol 1,4,5 trisphosphate (IP 3) contents, free calcium (Ca^{2+}) concentration, calmodulin (CaM), CaM-dependent protein kinase (CaM-PK) and protein kinase C (PKC) activities. Removal of Ts cells from activated T cells in traumatized mice could significantly elevate IL-2 mRNA and IL-2 R α mRNA levels, reverse the changes of cAMP, cGMP, IP 3 contents, Ca^{2+} concentration, CaM, CaM-PK and PKC activities. It is suggested that Ts cells posttrauma can suppress IL-2 and IL-2 R α gene expression by affecting cyclic nucleotide contents and phosphatidylinositol metabolism pathway in T cells.

Key words: Trauma Suppressor T cells Interleukin 2 Interleukin 2 receptor mRNA

克服昆明小鼠体外受精卵发育阻滞方法的研究

庞也非

李东 旭日千

(汕头大学医学院实验动物中心 515031) (内蒙古大学实验动物研究中心)

近年来,对哺乳动物的体外受精及胚胎发育的研究日益深入。这些研究的一个重要的基础就是胚胎的早期培养。因此,建立稳定、可靠的哺乳动物(包括人类)胚胎的体外培养系统,已成为当前这一领域里的重要研究课题之一。

小鼠作为哺乳动物胚胎发育研究的对象,具有很多优点。但一些常用的品系如NIH、昆明种等的早期胚胎在进行体外培养时,不同程度地呈现出“2细胞阻滞”现象^[1],而克服哺

乳动物胚胎的发育阻滞已成为目前的研究重点之一。

本研究以昆明小鼠为材料,用体外受精的方法获得早期胚胎,并采用不同的培养液及添加物进行对比试验,初步探索阻滞发生的机理,为发育生物学及其相关研究提供依据。

材料和方 法

1. 体外受精及受精卵的获得

精子及卵子均采自40—45克的10周龄以上的成

表1 TYH, WM, mWM 以及 CZB 培养液的成分及其比较

成分	浓度 (mmol/L)			
	TYH(a)	WM(b)	mWM	CZB(c)
NaCl	119.37	87.67	87.67	81.62
KCl	4.78	4.83	4.83	4.83
KH ₂ PO ₄	1.19	1.18	1.18	1.18
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1.19	1.17	1.17	1.18
NaHCO ₃	25.07	22.62	22.62	25.12
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	1.71	—	—	1.70
Glucose	5.56	5.56	—	—
Glutamine	—	—	—	1.00
EDTA	—	—	—	0.11
乳酸钙, 5 H ₂ O	—	1.72	1.72	—
乳酸钠	—	22.20	31.30	31.30
丙酮酸钠	1.00	0.31	0.27	0.27
牛血清白蛋白(mg/ml)	4.00	4.00	4.00	4.00
青霉素(u/ml)	100	100	100	100
链霉素(mg/ml)	0.05	0.05	0.05	0.05
酚红(mg/ml)	0.01	0.01	0.01	0.01

* a, b, c: 分别见参考文献[2-4]。

熟昆明小鼠, 具体方法见参考文献^[3]。操作时需注意严格无菌, 以防止污染引起的受精率低下及发育中断。表1为本研究所需各种培养液配方及其成分对比。

2. 受精卵的发育培养和检查

体外受精结束后, 须将卵子由受精用培养液中转移至发育用培养液中, 以进行下一步的发育培养。方法是用微吸管将受精微小滴中的正常卵子全部吸出, 用相应的培养液洗3次后移入不同的发育用培养液微小滴中。本研究使用的发育用培养液为Whitten(WM)培养液, 实验中对其成分进行了适当的调整。而培养时的温度、湿度及气相条件等均与受精时相同, 并分别于发育培养后的第一、二、三、四天观察胚胎的发育情况, 计数并记录结果。所得数据进行统计学处理。

不同实验的具体设计如下:

实验1: 应用WM和CZB培养液进行受精卵的培养, 以观察是否有发育阻滞的发生。

实验2: 分别在WM培养液中添加EDTA, Gln(谷氨酰胺)和EDTA+Gln。添加量与CZB培养液含量相同, 以观察这两种成分对胚胎发育的单独或协同影响作用。

实验3: 将WM培养液成分进行部分修饰, 具

体是将乳酸钠和丙酮酸钠的含量调整至与CZB培养液相同, 并去除葡萄糖成分(见表1)。在培养时进行添加葡萄糖的对照实验。

结 果

在实验1中, 受精卵分别在WM和CZB培养液中培养, 其卵裂率分别为78%和85%, 两者间无显著差异; 在培养的第二日, CZB培养液中有79%的卵发育至4细胞期, 而WM中只有25%的卵发育为4细胞胚胎。在培养的第三日, WM中仍有48%的胚胎停留在2-8细胞期, 而在CZB培养液中, 有64%的卵发育为桑椹胚, 共有42%的培养胚胎发育为囊胚及孵化囊胚。两处理组间有极显著的差异($P < 0.01$, 见表2)。

实验2的结果表明, 在WM中只添加谷氨酰胺的处理组中, 仅有10%的胚胎发育至4细胞期, 其后也只有6%发育为8细胞胚胎; 而在添加EDTA和EDTA+谷氨酰胺的处理组中, 分别有64%和69%的胚胎发育至4细胞期; 在培养的第三天, 后一处理组中有

表2 小鼠IVF卵在WM和CZB培养液中的发育情况

培养液	培养卵子数	Day 1 %			Day 2 %			Day 3 %			Day 4 %		
		1C	2C	AB	2C	4C	AB	2C	MO	EB	BL	PB	HB
WM	75	20	78	2	56	25 ^a	8	48 ^c	18 ^e	0	0	0	0
CZB	99	12	85	3	5	79 ^b	6	3 ^d	64 ^f	17	13	21	8

$b > a, c > d, f > e, p < 0.01$

1c, 2c, 4c, 1,2,4 细胞期; AB: 异常胚; MO: 桑椹胚; EM: 早期囊胚; BL: 囊胚; PB: 扩张囊胚; HB: 孵化囊胚

表3 在WM中添加EDTA和Gln对胚胎发育的影响

培养液	培养卵子数	Day 1 %			Day 2 %			Day 3 %			Day 4 %		
		1C	2C	AB	2C	4C	AB	8C	MO	EB	BL	PB	HB
WM+Gln	78	15	71	14	62	10	18	6	0	0	0	0	6
WM+EDTA	70	20	76	4	9	64	14	16	37	0	30 ^a	4 ^b	9 ^c
WM+G+E	65	27	73	0	4	69	9	0	51	16	11 ^d	51 ^e	4 ^f

* $d+e+f > a+b+c, P < 0.01$

表4 胚胎在mWM培养液中的发育

培养液	培养卵子数	Day 1 %			Day 2 %			Day 3 %			Day 4 %		
		1C	2C	AB	2C	4C	AB	8C	MO	EB	BL	PB	HB
mWM	45	40	53	7	20	29	7	29	9	0	0	0	0
mWM+Glu*	51	24	55	21	24	12	35	20	0	0	0	0	0

* mWM+葡萄糖

67%的胚胎发育为桑椹胚和囊胚; 而添加EDTA的培养液中只有37%的胚胎发育为桑椹胚。添加EDTA+谷氨酰胺培养液的培养效果明显好于其他两组, 多项指标均有极显著的差异($P < 0.01$, 见表3)。

实验3的结果显示, 在修饰WM培养液中有29%的胚胎发育至4细胞期; 38%发育为8细胞胚胎和桑椹胚。而在修饰WM培养液+葡萄糖的处理组中, 只有12%的胚胎发育至4细胞期, 20%发育为8细胞胚胎, 两组间无显著差异。但后一处理组中的异常胚比例远高于前组, 差异极为显著($P < 0.01$, 见表4)。

讨 论

在进行昆明小鼠早期胚胎的体外培养时, 会出现发育的阻滞, 而其他远交品系小鼠中也

有类似的现象^[6]。笔者曾采用昆明小鼠输卵管上皮细胞与小鼠IVF卵共同培养的方法突破了胚胎的“2细胞阻滞”^[5]。但输卵管上皮细胞的培养较为复杂, 有时难以成活。本研究采用化学成分明确的培养液, 较好地解决了这一问题。实验1的结果显示: 在CZB培养液中, 胚胎的发育阻滞得到了克服, 而WM培养液中的胚胎则发生了发育阻滞, 培养的第三天仍有48%的2细胞胚胎, 且只有18%的胚胎发育为桑椹胚; 而CZB培养液中后者的比例达到了64%, 并能够继续发育为囊胚并孵化。这说明CZB培养液满足了胚胎发育的基本要求, 其成分中的谷氨酰胺和EDTA及其他有效成分的作用产生了克服阻滞的效应。因此, 可作为一种有效的抗阻滞培养液而应用。

WM和CZB这两种培养液的最大不同是

CZB 中含有 EDTA 和谷氨酰胺。为研究这两种成分对胚胎发育的影响,将其分别及共同加入 WM 培养液中进行胚胎的培养。结果证明,单独添加谷氨酰胺不能克服发育的阻滞,与实验 1 的结果比较,甚至还有一定的抑制发育的作用。单独添加 EDTA 后,2 细胞阻滞现象得到了克服,但随后的发育率尚不理想。曾有文献报道在培养液中添加 EDTA 可有效地克服 ICR 品系小鼠胚胎的发育阻滞^[7]。而将二者同时添加于 WM 培养液中则可克服发育阻滞并提高囊胚的发育率,培养第四日的囊胚总发育率达到 66%,显著高于 EDTA 添加组 ($P < 0.01$)。这表明 EDTA 和谷氨酰胺具有协同作用,可有效地克服阻滞并促进胚胎发育。一些研究者认为,谷氨酰胺在胚胎发育中可能具有供能物质的作用^[8],可能提供代谢中氨基氮的来源^[9],也可能在代谢中较其他氨基酸更具有运输方面的竞争性^[10]。

CZB 培养液和 WM 培养液的另外不同点就是乳酸钠和丙酮酸钠的比值较高且不含葡萄糖,据报道提高这一比值可促进胚胎的早期发育^[11],且葡萄糖对胚胎的早期发育具有抑制作用^[2]。由于这几种成分直接参与胚胎的代谢,故其比例的改变对胚胎的发育具有很大的影响。在实验 3 中并未观察到胚胎发育的改善,在其中添加原有含量的葡萄糖也未能提高发育率。其原因可能与培养液的渗透压的变化有关,但确切的机理还不清楚。

体外培养胚胎的发育阻滞是一个较为复杂的现象,可能与代谢中的多种因素有关。本研究仅就建立可靠的胚胎培养系统和探讨阻滞的机理进行了初步的研究,而有关这方面的确切机理则需要进一步的实验加以探索。

摘 要

本研究应用 CZB 和 WM 培养液进行昆明

小鼠体外受精胚胎的发育培养,建立了一个可行的胚胎体外培养的新方法,并通过改变培养液的成分及其含量,对胚胎发育的阻滞机理和突破方法进行了初步的探索。培养于 WM 中的受精卵发生阻滞,有 48% 停留于 2 细胞阶段;而 CZB 中的胚胎有 81% 发育为桑椹胚和囊胚。在 WM 中添加 EDTA 和谷氨酰胺得到了 66% 的囊胚;加大 WM 中乳酸钠和丙酮酸钠的比值未能克服发育的阻滞现象。实验结果表明,EDTA 和谷氨酰胺在克服阻滞时具有协同作用。

关键词: 体外受精 胚胎培养 2-细胞阻滞

参 考 文 献

- [1] Barvister B. D., 1987, *The Mammalian Preimplantation Embryo*, pp 228.
- [2] Whitten W. K. and Biggers J. D., 1968, *J Reprod Fert.*, 17: 399—403.
- [3] Chatot C. L. et al., 1989, *J Reprod Fert.*, 86: 679—688.
- [4] Toyoda et al., 1971, *Jpn J Anim Reprod.*, 16: 147—151.
- [5] 庞也非、旭日干, 1990, *细胞生物学杂志*, 12(4): 175—180.
- [6] First N. L. and Barnes F. L., 1989, *Development of preimplantation mammalian embryos*, pp 1551.
- [7] Hoshi M. and Toyoda Y., 1985, *Jpn J Zootech Sci.*, 56(12): 931—937.
- [8] Kane M. T. and Foote R. H., 1970, *Proc Soc Exp Biol Med.*, 133: 921—925
- [9] Brinster R. L., 1970, *J Reprod Fert.*, 21: 17—22.
- [10] Carney E. W. and Bavister B. D., 1986 *Biol Reprod.*, 34(Suppl. 1): 199 a.
- [11] Cross P. C. and Brinster R. L., 1973, *Exp Cell Res.*, 77: 57—62.

THE STUDY FOR THE MECHANIZMS OF DEVELOPMENT BLOCK OF KM MOUSE EMBRYOS DERIVED FROM IVF

Pang Yefei

(The laboratory animal center of Shantou university medical college)

Li Dong Shorgan

(The laboratory animal research center of Inner Mongolia University)

ABSTRACT

The CZB and Whitten media were employed in this study for the development of in vitro fertilized embryos of KM mouse, established a new practical method for the culture of KM mouse embryos, and by way of changing the composition and its content of the medium, the preliminary study were carried out for the mechanizms of embryo development block and the method to overcoming it. In Whitten medium, 48% of the embryos were blocked at the 2-cell stage, but 81% of the embryos cultured in the CZB medium developed as morulae and blastocysts. Total of 66% blastocysts were obtained by means of adding EDTA and Glutamine to Whitten medium. Increase the ratio of lactic acid and Na -Peruvate in the Whitten medium did not overcome the development block. The results of the experiment suggested that EDTA and Glutamine has some co-effect on overcoming the 2-cell block of embryo development.

Key words, in vitro fertilization Embryo culture 2-cell block

爪蟾肌细胞的决定

吴芝莉

(中国科学院上海细胞生物学研究所 200031)

两栖类中胚层是在内胚层的诱导作用下形成的,这种诱导作用发生得很早(从卵裂到囊胚),在原肠形成开始时就已完成。但是,这时期中胚层细胞究竟分化为中胚层的哪一部分还没有决定。

在蝶螈,已经有实验证实,在神经胚早期中胚层各部分,包括背部的肌细胞,侧方的原肾物质以及腹方的红细胞还没有完全决定,要到神经胚中期它们才获得稳定的决定^[1]。爪蟾肌细胞的决定尚未有过报道。

爪蟾和蝶螈在发育的某些方面是有差别

的。就脊索的决定来说,蝶螈要比爪蟾早。蝶螈的脊索在原肠晚期,当脊索原基刚能和两侧肌节分离开来时已经决定。爪蟾脊索的决定是从原肠晚期到神经褶期逐渐完成的^[2]。

爪蟾肌细胞的决定有一个逐渐稳定的过程,在什么时期才稳定下来,是值得弄清楚,这也是进一步研究肌细胞的决定和分化所必需的。

本文在曾弥白教授的指导下完成,谨表深切谢意。

照片由暗室金建中冲洗放大,特此致谢。