

the culture of MCs were investigated. The effects of insulin, bFGF, ET-1 and TNF $\alpha$  on the proliferation of the cultured MCs was determined. The results showed that insulin, bFGF, ET-1 and TNF $\alpha$  significantly stimulated the proliferation of MCs ( $P < 0.01$ ), of them, the effect of bFGF on the proliferation of MCs was the strongest; insulin exhibited synergetic stimulatory effect with bFGF, TNF $\alpha$  or lower concentration of ET-1 ( $\leq 10^{-8}$  mol/L) ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ), synergetic inhibitory effect with higher concentration of ET-1 ( $\geq 10^{-7}$  mol/L) ( $P > 0.05$ ) on the proliferation of MCs.

**Key words:** Glomerulus MC Cell culture Cell proliferation

## 利用静电场提高 IVF 小鼠胚胎发育率的研究\*

何牧仁 高 飞 旭日干

(内蒙古大学实验动物中心 呼和浩特 010021)

自从 1951 年张明觉<sup>[1]</sup>教授和 Austin<sup>[2]</sup>发现了哺乳类精子获能现象以来,家畜体外受精(in vitro fertilization, IVF)技术的发展十分迅速,现已成为畜牧业生产中应用的高科技生物技术。目前在家畜 IVF 技术中,有关卵母细胞及 IVF 胚培养系统的研究工作得到了人们的普遍关注。在现行的培养条件下,家畜 IVF 卵囊胚发生率大多只能达 30%—40% 左右<sup>[8,11]</sup>,且这些胚胎在质量上与体内发育胚胎相比差异较大。为了缩小这种差异,人们除了改善各种培养基以外,还对培养系统温度<sup>[4]</sup>、气相<sup>[5]</sup>等物理因子进行了系统的研究,然而很少有人把电场对 IVF 过程的影响作为一个必要的物理因子来研究和应用。因为,动植物一直生长在地球这个巨大的静电场中,其漫长的发展史造就了它们对环境的适应以及利用环境因素促进自身发展的遗传特性。生物体也有一个复杂的电磁场,可以说,只要有生命运动,就伴随着生物电发生。Cross 证明小鼠未成熟卵母细胞在成熟过程中伴随膜电位变化<sup>[9]</sup>,这个电位差是细胞进行新陈代谢不可缺少的条件。新近的研究表明,电流控制生物体的极性,极性则控制着生物体生长和发育的方向。适当地控制或改变生物体的极性,就有可能影响和刺激有机体的生长发育。外加电场在一定程度上也

是通过影响和控制细胞的极性而影响生长发育的<sup>[7]</sup>,所以本研究将用小鼠 IVF 胚作为生物模型,探讨静电生物学效应,为今后静电场在牛、羊、猪等家畜 IVF 中的应用提供有价值的科学依据。

### 材 料 和 方 法

#### 1. 实验动物

本研究采用内蒙古大学实验动物中心饲养的昆明系小鼠,雌鼠为 8—10 周龄,雄鼠为 10—12 周龄,均为清洁级标准化实验动物(合格证书:京动字 8806 M 35)

#### 2. 精子的准备

将供精雄鼠处死后取出附睾,剪开附睾管,用无菌玻璃针挑取一滴精液,放入预先平衡于 CO<sub>2</sub> 培养箱中的、液体石蜡(sigma)覆盖的 0.3 ml 受精用培养液 TYH<sup>[6]</sup>中,将精子扩散后取出玻璃针,放入 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 湿度 84%—99% 条件下的 CO<sub>2</sub> 培养箱内培养 1.5 h,以备受精时用。

#### 3. 卵子的准备

将供卵雌鼠皮下注射 PMSG(天津实验动物中心) 5 iu, 48 小时后腹腔注射 5 iu 的 HCG(宁波激素制品厂)进行促排处理, HCG 注射 12—16 h 后取出输卵管,放入覆盖受精用培养液滴的液体石蜡中,以小刀将输卵管膨大部切下,用解剖针将卵块引入 0.2 ml 受

\* 国家自然科学基金资助项目(59567001)。

精用微小滴中,放回CO<sub>2</sub>培养箱内待受精,切下的输卵管膨大部再用小刀纵切,暴露出内皮细胞,经发育培养液洗涤后,放入发育培养用微小滴中。

#### 4. 体外授精

获能培养结束后,根据已知精子悬液浓度,用微量移液管吸取适量的精子悬液,缓慢注入含有卵块的受精用微小滴中,使其内精子浓度为0.5—1.0×10<sup>6</sup>/ml。

#### 5. 胚胎的电场处理

将授精后6—7h小时的卵子从微小滴中吸出,用发育用培养液洗涤3次,移入发育用微小滴(M<sub>16</sub><sup>91</sup>+0.1mmol/L EDTA+输卵管上皮)中,在CO<sub>2</sub>培养箱中培养。

实验1:将授精后24h出现的2细胞胚均等地分为4组,一组为对照组,另三组为处理组1、2、3。电场是由ZGF 60KV/2mA式直流变压发生器(大连电源技术有限公司)通过一组平板提供的恒定电场,三个处理组分别用1.84KV/cm、5KV/cm、7.8KV/cm的电场处理5min。分别在24h、72h、48h、96h、120h在立体显微镜下检查,统计其发育率。

实验2:实验分组同实验1,三个处理组按实验1选择的最佳场强分别处理1min、5min、10min。

实验3:根据实验1、2选择的最佳处理剂量(场强和时间),分别处理原核期、2细胞、4细胞期胚胎,然后观察其发育率。

## 结 果

### 1. 静电场场强对IVF小鼠胚胎发育的影响

在实验1中,利用不同强度的电场处理2细胞期胚胎,观察电场强度的变化对胚胎发育过程的影响。结果见表1,电场强度较低时对囊胚的发生率没有明显的作用,但场强达到适宜的剂量时,囊胚率和囊胚孵化率分别为56.6%和39.1%,与对照组的35.4%和17.7%有极显著差异( $P<0.01$ ),表明了2细胞期的小鼠胚胎受到适宜的电场刺激后对其后期的生长发育有着较为明显的促进作用。处理组1的囊胚率与对照组相比无显著差异( $P>0.05$ ),处理组2的囊胚率(56.5%)与处理组1的囊胚率(42.4%)相比差异显著( $P<0.05$ ),而囊胚孵化率却存在极显著差异( $P<0.01$ ),表明只有场强达到一定的剂量时才对小鼠胚胎表现出刺激效应,并且这种刺激效应对胚胎后期发育效果的影响尤为明显。处理组3的囊胚率和孵化率与处理组1相比差异极显著( $P<0.01$ ),并且低于对照组的囊胚率和囊胚孵化率,说明

表1 不同电场场强对小鼠胚胎发育的影响

处理组 groups	授精后 24 h 24 h after insemination	48 h 48 h	72 h 72 h	96 h 96 h	120 h <sup>1</sup> 120 h
	2 细胞 2-cell	4 细胞 4-cell (%)	≥8细胞 ≥8-cell (%)	囊 胚 blastocyst (%)	孵化囊胚 hatched blastocyst (%)
对照组 group	158	146 (92.4±1.7)	134 (85.4±2.1)	56 (35.4±1.1) <sup>a</sup>	28 (17.7±1.8) <sup>e</sup>
处理 1 group 1	92	83 (89.2±2.0)	78 (84.7±1.1)	39 (42.4±1.6) <sup>b</sup>	19 (20.6±1.9) <sup>f</sup>
处理 2 group 2	115	103 (89.6±1.6)	99 (86.1±1.9)	65 (56.5±1.6) <sup>c</sup>	45 (39.1±1.8) <sup>g</sup>
处理 3 group 3	89	79 (88.8±1.9)	73 (82.0±1.1)	41 (31.4±1.5) <sup>d</sup>	14 (15.7±2.0) <sup>h</sup>

注:6次试验结果的总数。

g>a, d g>e, f, h p<0.01; c>b p<0.05

高强度的电场刺激对胚胎发育有一定的抑制作用。

## 2. 不同处理时间对小鼠胚胎发育的影响

在实验中,在电场强度恒定的情况下,探讨了不同处理时间对小鼠胚胎发育的情况。结果见表2。5 min处理组的囊胚发生率和囊胚

孵化率与对照组和1 min处理组的囊胚率和囊胚孵化率都具有极显著差异( $P < 0.01$ ),而与10 min组间无差异;10 min组的囊胚率和囊胚孵化率与对照组和1 min组相比存在显著差异( $P < 0.05$ ),上述结果表明处理场强适宜时,只要处理时间达到一定阈值能引起刺激效应之

表2 不同处理时间对小鼠胚胎发育的影响

处理组 groups	授精后 24 h 24 h after insemination	48 h 48 h	72 h 72 h	96 h 96 h	120 h 120 h
	2 细胞 2-cell	4 细胞 4-cell (%)	$\geq 8$ 细胞 $\geq 8$ -cell (%)	囊胚 blastocyst (%)	孵化囊胚 hatched blastocyst (%)
对照组 control	145	130 (89.7±2.3)	121 (83.4±1.6)	61 (42.1±1.3) <sup>a</sup>	29 (20.0±1.9) <sup>e</sup>
1 min	118	107 (90.6±1.6)	100 (84.7±2.0)	47 (39.8±1.6) <sup>b</sup>	21 (17.8±1.8) <sup>f</sup>
5 min	165	152 (92.1±1.8)	137 (83.0±1.3)	106 (64.2±1.7) <sup>c</sup>	74 (44.8±1.8) <sup>g</sup>
10 min	128	113 (88.3±1.9)	108 (84.4±1.1)	64 (50.0±1.6) <sup>d</sup>	45 (35.2±1.7) <sup>h</sup>

注: 6次试验结果的总数。

c>a, d g>e, f, p<0.01; d>a, b h>e, f p<0.05

表3 不同细胞期的静电刺激对小鼠胚胎发育的影响

处理组 groups	6 h 原核期 pronucleus	授精后 after insemination				
		24 h 2-细胞 2-cell (%)	48 h 4-细胞 4-cell (%)	72 h $\geq 8$ -细胞 $\geq 8$ -cell (%)	96 h 囊胚 blastocyst (%)	120 h 孵化囊胚 hatched blastocyst (%)
对照组 (control)	144	136 (94.4±1.6)	126 (87.6±1.3)	116 (80.6±1.8)	61 (42.4±1.7) <sup>a</sup>	30 (20.8±1.9) <sup>e</sup>
1-细胞 1-cell	126	120 (95.2±2.0)	109 (86.5±1.6)	101 (80.2±1.9)	85 (67.5±2.0) <sup>b</sup>	61 (48.4±1.3) <sup>f</sup>
2-细胞 2-cell	162	156 (96.3±2.1)	142 (87.6±1.7)	134 (82.7±2.0)	99 (61.1±2.0) <sup>c</sup>	66 (40.8±1.4) <sup>g</sup>
4-细胞 4-cell	126	118 (93.6±2.2)	108 (85.7±2.0)	99 (78.6±1.8)	60 (47.6±1.9) <sup>d</sup>	30 (23.8±1.6) <sup>h</sup>

注: 六次实验的结果。

b, c>a, d; f, g>e, h, P<0.01

后,处理时间的长短对小鼠胚胎发育的影响不是很大,在较大的范围内都能促进胚胎发育。

### 3. 不同细胞期的静电刺激对小鼠胚胎发育的影响

在电场强度和處理时间恒定的情况下,利用电场刺激不同细胞期的胚胎,探讨不同细胞期的静电刺激对它们后期发育的影响。结果见表3。1细胞、2细胞期处理组的囊胚和囊胚孵化率与对照和4细胞期相比存在极显著差异, ( $P < 0.01$ ), 并且1细胞期组的囊胚和囊胚孵化率比2细胞的高, 但无显著差异 ( $P > 0.05$ )。表明不同细胞期的胚胎对电场刺激的敏感性不同。

## 讨 论

近年来,随着家畜体外受精技术进一步完善和“发育阻滞(block of development)”现象的有效克服,使该项技术发展十分迅速,现已成为应用于畜牧业生产中的高科技生物技术。因此,为了使家畜IVF技术完善化和高效率化,有关体外受精卵体外发育和胚胎质量的研究越来越受到人们的重视。本研究利用静电场处理小鼠2细胞胚胎,最佳处理组囊胚率与对照组相比提高22.1%,囊胚孵化率提高24.8%,都具极显著差异 ( $P < 0.01$ ), 并观察到囊胚和孵化囊胚有提前出现的迹象,说明静电刺激对小鼠胚胎具有较强的促进胚胎发育的作用。从实验结果分析,在场强和时间两个因子中,场强在对胚胎的刺激过程中具有主要作用,但场强超过一定数值(850 KV/m)时对胚胎发育有抑制作用。场强适宜时,只要处理一定的时间能引起效应后,时间可在较大的范围内(5 min—10 min)刺激胚胎的发育。上述结果与作者用静电场处理家兔精液的结论是一致的<sup>[13]</sup>。

静电场刺激小鼠胚胎发育的机理问题,是一个相当复杂而又多方面作用的过程。在离体培养哺乳类着床前早期胚胎时,胚胎往往不能完成从受精卵到囊胚的发育过程,而停顿在某个特定发育时期,出现“发育阻滞”现象。我们

前期研究结果表明<sup>[14]</sup>,将受精后6h的合子用电场处理,不能克服“2细胞阻滞”,而将处理的胚胎培养于含输卵管上皮的培养液时,显著提高了囊胚率和囊胚孵化率,但对2细胞、4细胞和8细胞发生率没有影响,这结果表明,电场刺激不是直接作用于胚胎母性mRNA转向合子mRNA的调控过程,而可能是对胚胎透明带发生作用使其结构发生变化,加强了与输卵管上皮细胞合成释放的蛋白质之结合,从而支持了胚胎的正常发育。另外,Nasr-esfahani等根据研究结果提出了活性氧能阻断正常细胞分裂的观点<sup>[10]</sup>。然而,许多品系小鼠的早期胚胎几乎不能清除在离体培养过程中累积的活性氧,这可能与它们缺乏诸如过氧化物歧化酶、过氧化氢酶或者谷胱甘肽过氧化物酶/还原酶等保护细胞质的酶活性有关<sup>[15]</sup>。静电场提高植物种子<sup>[16]</sup>、家畜精子<sup>[13]</sup>内酶活性的观点,已被很多实验结果所证实。静电场刺激胚胎发育的另一途径可能是提高了胚胎内各种酶活性,清除了胚胎内外过量的 $H_2O_2$ ,从而提高了胚胎的发育能力。

哺乳类动物早期发育阻滞一般都发生在最初四个细胞周期中的某个长 $G_2$ 时相阶段,该时期恰好是贮存在胚胎细胞中源自母系的mRNA失活或降解、胚胎细胞自身基因组被激活的临界期,胚胎在这时对环 境压力非常敏感。哺乳类早期胚胎发育阻滞的时间往往与发育调控过渡的时间相关联<sup>[15]</sup>。Latham (1991)等报道小鼠胚胎在1细胞后期至2细胞中期,蛋白质合成发生最大的变化,认为这个时期是母性mRNA转向合子mRNA调控过渡阶段<sup>[11]</sup>。本研究在观察不同细胞期的电场刺激对胚胎发育的影响时发现,1细胞期(受精后6h)和2细胞期(受精后24h)胚胎对电场较为敏感,发育能力明显提高,这一结果有力地支持了上述观点。这为今后把静电技术应用与其他哺乳动物IVF过程,提供了很好的依据。到时只在该种动物胚胎“发育阻滞”前期给予静电刺激,便可能得到较好的促进发育的结果,

但这需要其他动物的实验来证实。

## 摘 要

本研究首先用静电场处理小鼠2细胞期胚胎,通过观察其发育率筛选了最佳处理剂量(场强和时间),在此基础上探讨了不同细胞期的静电刺激对小鼠胚胎发育的影响。结果表明:用静电场处理小鼠2细胞期胚胎,能显著提高胚胎的发育能力,最佳处理剂量的囊胚率从42.4%提高到64.5%,囊胚孵化率从20.0%提高到44.8%,与对照组存在极显著差异( $P < 0.01$ )。不同细胞期胚胎对静电刺激的敏感性不同,其中1细胞(授精后6h)和2细胞期(授精后24h)胚胎对电场刺激较为敏感。

**关键词:** 静电场 胚胎发育 最佳条件

## 参 考 文 献

- [1] Miyamoto H, Chang MC., 1972, *J. Reprod Fert*, 30: 135—137.
- [2] Scott L, Cohittingham DG., 1996, *Mol Peprod Dev*, 43: 336—346.
- [3] Fulvio Gandolfi., 1994, *Theriogenology*, 41: 95—100.
- [4] Wang Wl et al., 1994, Tth scientific meet. Eur. Embryo Tansfer Assoc. (Cambridge)
- [5] Nayao Y et al., 1994, *Theriogenology*, 41: 681—687.
- [6] Cross M H., 1973, *Dev. Biol*, 33: 413—416.
- [7] 宋霞、王晓佳, 1993, *生命科学*, 3: 24—26.
- [8] Kasai K., 1978, *Jpn. J. Anim. Reprod*, 24: 19—28.
- [9] Biggers J D. et al., 1971, *Methods in mammalian embryology*. Freeman, San Francisco. 86—116.
- [10] Nasr-esfahani M H. et al., 1990, *Development*, 109: 501—507.
- [11] Latham K E. et al., 1991, *Development*, 112: 921—932.
- [12] 旭日干等, 1993, *农业生物技术进展与展望*, 中国科学技术大学出版社, 174—187.
- [13] 何牧仁、刘震乙等, 1992, *静电研究与进展*, 内蒙古大学出版社, 148—151.
- [14] 何牧仁等, 1996, *静电基础及其应用技术*, 大连理工大学出版社, 240—245.
- [15] 李逸平、左嘉客, 1992, *细胞生物学杂志*, 4: 153—157.
- [16] 梁运章等, 1992, *静电研究与进展*, 内蒙古大学出版社, 135—138.

## THE STUDY OF ELECTROSTATIC FIELD STIMULATION TO PROMOTE IVF MOUSE EMBHYO DEVELOPMENTAL RATE

HE Mu Ren GAO Fei B. Shorgan

(The Research Centre for Laboratory Animal Science, Inner Mongolia University, Hohhot, 010021, PRC)

### ABSTRACT

The objective of this study was to use electrostatic field to stimulate the mouse 2-cell embryos, then according to their developmental rate to selecte the optimal dose (field intensity and treatment time). Using this optimal dose treatment on mouse embryos, the effects of electrostatic field stimulation at different cell stage on their developmental potential were also investigated.

The results showed: The electrostatic field can significantly promote the developmental rate of mouse embryos, at the optimal dose the blastocyst rate increased from 42.4% to 67.5%, hatched blastocyst rate increased from 20.0% to 44.8%, and there was significant difference between optimal dose and control ( $P < 0.01$ ). Different sensitivities existed among the embryos at different cell stage for the electrostatic field stimulation, to which the 1-cell to 2-cell stage embryos were significantly sensetive than others.

**Key words:** Electrostatic field Embryo development Optimal dose