

小鼠分离胚的培养和移植

张锁链 斯琴 樊秀娥 朱悦来 旭日干

(呼和浩特, 内蒙古大学实验动物研究中心 010021)

自从 Willadsen 把绵羊 2—8 细胞胚分离成两个或二群细胞, 然后移植给受体母羊之后得到了一卵性双胞胎羔羊以来^[1], 早期胚的分离(或分割)作为制作一卵双胞胎或多胎动物的一项新技术引起了许多人的关注。到目前为止, 相继有小鼠、山羊和牛的分离胚(或分割胚)移植均获得成功^[2-4]。

国内张涌^[5]和谭丽玲^[6]等用显微操作技术分别把山羊和牛的桑椹胚、囊胚分割为二分胚或四分胚移植后获得成功的结果, 但早期胚的分离方面迄今未见有成功的报道。本研究采用比较简便的处理方法将小鼠 2—4 细胞胚分离为二分胚, 并通过体外培养和移植试验观察了分离胚的个体发生能力及其所需条件, 以探索制作一卵双胞胎(或多胎)动物的新方法。

材料与 方法

一、供试动物的选择及胚胎的采集

实验用鼠是在本研究中心的全空调标准饲养室饲养的清洁级别小鼠, 饲养温度为 24 ± 2 度, 湿度 50—70%, 光照时间 12 小时, 换气 18 次/小时, 饲料是自行配制生产的固型饲料。选择 F₁ 代 (C₅₇ × BALB/C) 或 ICR 成熟雌鼠, 用 PMSG (长春生药厂) 和 hCG (宁波激素制品厂) 进行超排后与同品系雄鼠自然交配。在注射 hCG 后的 45 小时和 52 小时分别处死供体鼠取出输卵管, 用 Hanks 液在立体显微镜下从输卵管冲出 2—4 细胞期胚, 选择形态正常的胚胎用于分离试验。

二、胚胎的分离

将胚胎移入含有 0.5% 链霉蛋白酶的 Hanks 液中分别去掉透明带, 并用 Hanks 液洗滴后移入没有 Ca²⁺、Mg²⁺, 但加 0.02% EDTA 培养液中。用吸管轻轻吹打数次使胚胎分别分离成 1/2 半胚或 2/4 半

胚。

三、分离胚的培养

将分离后的半胚移至用石蜡油覆盖的培养液微小滴中, 在 37℃、5% 二氧化碳培养箱中进行培养。培养实验共包括四组。在实验 2 中培养基为 Whitten 和 BMOC-III, 其他三组实验均用 Whitten 培养基, 培养基中均添加 10% 的 FCS。胚胎培养 72 小时后, 根据发育为正常囊胚为指标观察了不同培养条件对分离胚发育的影响。

实验 1 透明带的保留与否及胚胎的分离过程对胚胎发育的影响 把 F₁ 代小鼠的去掉透明带的和保留透明带完整的 2 细胞胚和分离后的 1/2 半胚分别进行培养, 观察胚胎的发育情况。

实验 2 培养基不同对 1/2 半胚发育的影响 把 F₁ 代小鼠 2 细胞期分离胚 (1/2 半胚) 分别培养于 Whitten 和 BMOC-III 中, 观察培养基不同对 1/2 半胚发育的影响。

实验 3 分离胚发育阶段不同对培养结果的影响 将 F₁ 代小鼠 1/2 半胚 (2 细胞胚) 和 2/4 半胚 (4 细胞胚) 分别进行培养, 观察不同发育阶段的分离胚的发育情况。

实验 4 分离胚品种差异对培养效果的影响 把 F₁ 代小鼠的 1/2 半胚和 ICR 小鼠的 1/2 半胚分别培养, 观察了胚胎的品种间差异对培养效果的影响。

四、分离胚的移植

将分离后的 1/2 半胚、2/4 半胚、去透明带及保留透明带的未分离胚, 在 Whitten 中培养 48 小时后选取发育为正常的桑椹胚、囊胚期胚胎, 以 4—6 对同卵半胚或整胚为一组, 分别移植给 74 只假孕处理的雌鼠, 观察了受胎情况。

结 果

一、胚胎分离结果

把 F₁ 代小鼠和 ICR 小鼠的 2—4 细胞分别分离为 1/2 半胚或 2/4 半胚, 其结果如表 1 所

示。胚胎分离效果不受品种间差异的影响, 2细胞和4细胞胚的分离成功率均很高, 分别为100%和96.8—98.9%。

表1 F₁小鼠和ICR小鼠2—4细胞胚分离结果

动物	胚胎阶段	分离用胚(个)	实得半胚(个)	分离成功率(%)
F ₁ *	2细胞	118	236	100
	4细胞	94	186	98.9
ICR	2细胞	68	136	100
	4细胞	62	120	96.8

* C₅₇ × BALB/C

二、分离胚的培养结果

实验1 将保留透明带的和去掉透明带的2细胞胚以及分离后的1/2半胚分别在Whitten溶液中培养72小时, 结果见表2。实验结果表明透明带存在与否对小鼠2细胞胚的发育没有明显影响, 但分离后的半胚其发育率明显低于保留透明带的正常胚($p < 0.05$)。

实验2 将F₁代小鼠2细胞期分离胚分别培养于Whitten和BMOC-III两种培养基中, 培养72小时, 结果见表3。表中的未发育胚指不发育的1/2半胚, 退化胚指发育到一定阶段(8细胞期或桑椹胚期)不继续发育, 并开始退化的胚。实验结果表明本研究用的两种不同培养液(Whitten和BMOC-III)均适合于早期分离胚的培养。

表2 透明带的保留与否及胚胎的分离过程对胚胎发育的影响

胚胎类型	培养胚数	囊胚数(%)
保留透明带胚	102	99(97.1) ^a
去透明带胚	97	88(90.7) ^b
分离半胚	72	63(87.5) ^c

c < a ($p < 0.05$)

实验3 将F₁代小鼠1/2半胚和2/4半胚分别培养于Whitten培养基, 其发育结果见表4。表中双方发育指来自同一个胚胎的两个半胚均发育为囊胚期的胚胎, 一方发育指两个

表3 培养基不同对1/2半胚发育的影响

培养基	培养半胚	囊胚数(%)	未发育胚及退化胚(%)
Whitten	168	148(88.1)	20(11.9)
BMOC-III	136	111(81.6)	25(18.4)

表4 胚胎的发育阶段对分离胚发育的影响

胚胎阶段	培养胚数	发育囊胚数(%)		
		合计	双方发育	一方发育
1/2半胚	236	210(89.0)	200(84.7)	10(4.2)
2/4半胚	186	176(94.6)*	172(92.5)	4(2.1)

* $p < 0.05$

表5 动物的品种间差异对分离胚发育的影响

动物	培养胚数	囊胚数(%)	未发育胚及退化胚(%)
F ₁ (C ₅₇ × BALB/c)	144	132(91.7)*	12(8.3)
ICR	136	67(49.2)	61(44.9)

* $p < 0.01$

半胚中只有一方发育为囊胚期胚胎, 另一方为未发育胚的胚胎。实验结果表明, 胚胎的发育阶段不同(2—4细胞), 其分离胚的发育也有明显差异, 4细胞期分离胚的发育率优于2细胞期胚($p < 0.05$)。

实验4 将F₁代小鼠的1/2半胚和ICR小鼠的1/2半胚分别进行培养, 其结果见表5。表中未发育胚及退化胚与表3所指相同。从实验结果可知, 品种间差异对分离胚的发育有着明显影响, F₁代的胚优于来自纯系小鼠ICR的胚($p < 0.01$)。

三、分离胚的移植结果

移植实验1 将培养48小时后发育到桑椹胚或囊胚期胚的1/2半胚和2/4半胚分别以4—6对同卵半胚为一组移植给假孕处理第2天或第3天的雌鼠, 其结果见表6。在移植1/2半胚的23只受体中有3只雌鼠妊娠, 其中1只是假孕处理第3天的小鼠产仔2只, 另外2只是假孕处理第2天的雌鼠均在妊娠后的早期

表6 分离胚的移植结果(一)

移植胚胎	雌鼠假孕天数	胚移雌鼠数	妊娠雌鼠数(%)	产仔数
1/2 半胚	2	14	2(14.3)	0
	3	9	1(11.1)	2
2/4 半胚	2	10	0(0)	0
	3	9	1(11.1)	1

表7 分离胚的移植结果(二)

胚胎类别	移植胚数	受体鼠数	妊娠鼠数(%)	产仔数(%)
分离后的半胚	144	12	1(8.3)	4(2.8) ^a
去透明带胚	120	10	3(30.0)	13(10.8) ^b
保留透明带胚	120	10	6(60.0)	44(36.7) ^c

^a<^b<^c $p < 0.01$

阶段出现胎儿宫内死亡并被吸收。移植 2/4 半胚的 19 只雌鼠中只有 1 只雌鼠妊娠, 并产仔 1 只。以上结果表明, 分离后的半胚无论是 1/2 半胚还是 2/4 半胚均具有发育为正常个体的能力, 但受胎率很低。

移植实验 2 为了搞清分离胚移植受胎低的原因, 将去透明带的和保留透明带的未分离胚作为对照组, 与分离后的半胚一起用于移植实验, 结果见表 7, 移植雌鼠的妊娠率和产仔率在各组之间均有极显著差异 ($p < 0.01$)。这一结果表明, 移植胚透明带的去除和分离处理对移植后的个体发生均产生了一定程度的影响。

讨 论

Fiser 和 Macpherson 曾报道过小鼠去透明带的 1/2 半胚经体外培养后可以发育, 但很难移植成功^[7]。后来长岛等和角田、杉江等也证实了这一结论。他们认为分离后的半胚只有重新放入透明带中, 并且经体内培养一段时间后才能用于移植^[8]。但是, 富坚和铃木等则否定了上述看法。他们把小鼠 1/2 半胚和 2/4 半胚经体外培养后使其发育为囊胚期胚, 然后移植

给受体获得成功, 他们认为这种半胚和正常的整胚一样完全保持着其发育为正常个体的潜能^[9]。

从本研究的结果来看, 采用先去透明带然后在含有 EDTA 的溶液中用吸管吹打使小鼠 2—4 细胞分离为 1/2 或 2/4 半胚的方法, 操作起来比较简便, 不需要昂贵的显微操作器, 而且分离成功率可以稳定于 95% 以上。分离后的半胚经体外培养 48—72 小时后以很高的百分比 (80—90%) 发育为桑椹胚、囊胚期胚胎。这一结果与富坚等人的报道完全一致。但从本文的发育结果来看, 半胚所需的培养条件似乎有着明显的品种间差异。在以 Whitten 为培养基的条件下 F₁ 代 (C₅₇^{BL} × BALB/c) 小鼠的半胚, 其发育能力明显的优于纯系的 ICR 小鼠半胚。

另外从本文的移植实验结果还可以看出, 去透明带的半胚移植后的妊娠率和产仔率只有 8.3% 和 2.8%, 明显的低于对照组的去透明带的整胚, 去透明带的整胚和保留透明带的整胚之间也有显著差异。这说明透明带的有无和胚胎的分离与否, 尽管从培养结果上难以看出差异, 二者都能以很高的百分比发育为囊胚, 但是从移植结果来看在这三种不同条件下发育的囊胚可能在着床这一环节上或者进一步发育的潜能上有着明显的差异。Rand (1985) 的研究曾证实, 在体外培养条件下来自 1/2 半胚的囊胚其细胞数目相当于同样条件下从整胚发育而来的囊胚细胞数的一半, 而且内细胞团的细胞数在整个囊胚细胞数中所占的比例也明显小于正常胚胎^[10]。本研究尚未进行类似实验, 但从培养实验和移植实验结果所出现的差异来看, 可以肯定要想使胚胎分离技术作为获得一卵双胞胎或多胎动物的有效途径, 那么培养系统的改进仍然是最关键的环节。即通过进一步改进培养系统, 以增加由分离后半胚所发育出的囊胚的内细胞团的相对数量, 提高胚胎的发育潜能, 就有可能明显提高分离胚移植后的受胎率, 从而使这项技术进入实用阶段。

摘 要

将小鼠 2—4 细胞胚分离成为 1/2 半胚或 2/4 半胚后,在体外条件下进行培养,选择发育为桑椹胚、囊胚期的胚胎移植给假孕雌鼠。结果是,分离胚的囊胚发育率在 Whitten 和 BMOC-III 中分别为 88.1% 和 81.6%, 1/2 半胚和 2/4 半胚的发育率分别为 89.0% 和 94.6% ($p < 0.05$), F_1 代和 ICR 1/2 半胚的发育率分别为 91.7% 和 49.2% ($p < 0.01$)。在移植 1/2 半胚和 2/4 半胚的雌鼠中分别有 3 只和 1 只妊娠并产仔鼠 2 只和 1 只;在以 1/2 半胚,去透明带的整胚和保留透明带的整胚为对照移植的三个处理组中其雌鼠的妊娠率和产仔率分别为 8.3% 和 2.8%, 30.0% 和 10.8%, 60.0% 和 36.7%, 各处理组间均有显著差异 ($p < 0.01$)。

参 考 文 献

- [1] Willadsen, S. M., 1979, *Nature*, 277: 298—300.
- [2] Tsunoda, Y. & McLaren, A., 1983, *J. Reprod. Fert.*, 69: 315—322.
- [3] Tsunoda, Y., et al., 1984, *Jpn. J. Zootch. Sci.*, 55: 643—647.
- [4] Willadsen, S. M. & Polge, C., 1981, *Vec. Rec.* 108: 211—213.
- [5] 张涌等, 1987, 西北农业大学学报, 15 (2): 102—104.
- [6] 谭丽玲等, 1990, 畜牧兽医学报, 21(3): 193—198.
- [7] Fiser, P. S. & Macpherson, J. W., 1976, *Can. Anim. Sci.*, 56: 33—36.
- [8] Nagashima, H., et al., 1982, *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 28: 20—23.
- [9] Mamoru, T., et al., 1987, *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 33(2): 51—56.
- [10] Rand, G. F., 1985, *J. Exp. Zool.*, 236: 67—70.

长春新碱对小鼠早期胚胎发育的影响

张振玲* 韩貽仁 王 何* 高健刚

(济南, 山东大学生物系 250100)

长春新碱(Vincristine, VCR)是从蔓长春花植物的叶、皮、茎分离出来的生物碱^[1]。本世纪五十年代末,加拿大和美国各有一组科研人员对长春新碱和长春花碱的特性进行研究,证明它们对肿瘤确有积极的治疗作用^[2]。VCR 的抗肿瘤作用主要是抑制微管的装配,破坏有丝分裂器。这种抗癌药物不是瘤细胞的专一抑制剂,除对瘤细胞有一定的杀伤作用外,对正常细胞亦有毒害^[3-6]。关于 VCR 对小鼠胚胎发育影响已有报道,但研究集中在着床后胚胎。有的学者^[7]给怀孕母鼠体内注射药物,发现 VCR 对着床前小鼠胚胎的高尔基器有破坏作用。这种成体给药的实验方法不易控制胚胎的直接受毒剂量以及胚胎与药物的接触时间。关于 VCR 对早期胚胎发育的直接作用尚未见报道。我们采用体外培养的方法^[8]观察了 VCR

对着床前胚胎发育的影响,并对胚胎细胞超微结构变化作了分析。

材 料 与 方 法

一、动物

体重 30 g 左右性成熟的健康昆明小鼠。

二、培养液的配制

根据 Hogan. B 的配方^[9]配制 M_{16} 培养液。除丙酮酸钠(sodium pyruvate)是进口(德国 MERCK)试剂外,其余试剂均为国产。

三、含药培养液的配制

将 1 mg (有效剂量)的 VCR 完全溶解于 100 ml M_{16} 培养液中,配成 1/100 的母液,根据实验需要,用 M_{16} 培养液逐步稀释不同的浓度。

四、胚胎的收集及培养

* 工作单位: 山东省医学科学院劳动卫生职业病防治研究所。