

## 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<sup>[1]</sup>。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<sup>[2]</sup>。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<sup>[3-6]</sup>。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<sup>[7]</sup>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<sup>[8]</sup>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<sup>[9]</sup>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。

采用自然排卵的方法收集胚胎,取胚过程按韩贻仁<sup>[10]</sup>介绍的方法在无菌室内进行。挑选发育正常的胚胎,用微吸管分别吸入对照和加药的培养液中培养,每次实验都设有对照组,体外培养引起的发育延迟就不再考虑。培养的胚胎每隔4-8h检查一次,根据形态学变化,确定胚胎发育的情况和阶段。一般在体外培养36h后仍不发育的胚胎,我们就算作死亡的胚胎。在胚胎培养的后期,将对照组和加药组的桑椹胚、囊胚分别归类,最后对结果进行统计分析。

### 五、透射电镜标本制作

将对照组和加药组的小鼠胚胎培养10h后制作电镜标本。小鼠胚胎较小,须先用1.5%琼脂进行预包埋,然后再按常规的电镜标本制作方法<sup>[11]</sup>固定、包埋、染色,最后在JEM-100CX透射电镜下观察。

## 结 果

### 一、药物对早期胚胎发育的影响

下表列出了药物作用的数据。正常的8细胞胚胎在M<sub>1</sub>培养液中培养一段时间后,分裂球互相挤紧,形成无明显细胞界限的桑椹胚(图版图1)。临床剂量(75μg/L)的VCR对胚胎发育的影响较大,从8细胞阶段开始培养,无一能发育至囊胚。加25μg/L的长春新碱,发育至桑椹胚的比率为32%,发育至囊胚的只有12%。在培养过程中还发现,8细胞胚胎在25μg/L VCR中培养一段时间后,部分胚胎挤紧的分裂球又松开,有的分裂球散碎(图

表 VCR对体外培养的8细胞小鼠胚胎发育的影响

实验组	培养的8细胞胚胎总数	发育至桑椹胚个数	百分率	发育至囊胚个数	百分率
对照	46	44	95.65	40	86.95
I 75 μg/L	60	16	26.67	0	0
对照	38	32	84.2	32	84.2
II 25 μg/L	50	16	32.0	6	12.0
对照	49	45	91.8	43	87.75
III 12.5 μg/L	36	20*	55.5	8	22.2

\*与对照组相比,  $\chi^2 = 6.47$   $P < 0.05$  统计学上仍有显著差异

版图2),不能发育至桑椹胚。由表中第III组可以看出,加12.5μg/L VCR培养胚胎细胞,发育至桑椹胚的比率比前两种剂量有所提高,但用统计学方法计算, $P < 0.05$ ,与对照组相比,仍有显著差异,说明12.5μg/L剂量对胚胎发育影响仍旧很大。同样,发育至囊胚的比率为22.2%,统计学上的差异就更明显了。在12.5μg—75μg/L剂量下培养了25个4细胞胚胎,结果所有的4细胞胚胎都未发育,说明4细胞胚胎对此剂量范围的长春新碱都很敏感,也说明从4细胞开始培养比从8细胞开始培养要困难得多。

### 二、电镜观察VCR对小鼠着床前胚胎的影响

(1)正常的小鼠早期胚胎电镜切片可以观察到核多呈圆形,核仁及染色质都非常清晰(图版图3);而加VCR培养的胚胎细胞,细胞核变形,核膜呈不规则的凹凸,核仁凝缩,异染色质模糊不清(图版图4)。(2)在正常小鼠胚胎切片上,还可看到细胞之间互相挤压,接触面扩大且紧密,形成细胞间连接;而加VCR的胚胎细胞之间仍有空隙,并不形成胞间连接,细胞间隙处的细胞表面上伸出微绒毛。(图版图5)。(3)在实验观察中还发现:正常胚胎细胞电镜切片上,显示小鼠胚胎细胞中的脂体及大量的网架结构,(图版图6),而加VCR的胚胎切片上却发现脂体周围常密集围绕许多线粒体(图版图7)。

## 讨 论

### 一、药物作用与胚龄的关系

在对照和加VCR的培养过程中我们都发现,从4细胞阶段开始培养比从8细胞阶段开始培养困难。这一方面说明,随着胚龄的增加,胚胎的成活率也相对提高;另一方面也可能是由于胚胎不同阶段对药物的敏感性不同。

### 二、药物作用的剂量

临床剂量的VCR(75μg/L)能严重影响早期胚胎的发育,随着剂量的降低,胚胎的成活

率有所提高,但在临床应用上要慎重。Baranska, W 给怀孕雌鼠按每公斤体重注射 75  $\mu\text{g}$  长春新碱,发现各阶段的胚胎(从 1 细胞到囊胚)的发育率都降低了,这与我们在体外培养所得结果相符。

### 三、VCR 所引起的超微结构变化

电镜观察 VCR 能引起细胞核形态及核内结构的变化,变形原因还需进一步探讨。

与 VCR(25  $\mu\text{g}/\text{L}$ ) 接触的大多数胚胎的细胞间不形成连接,细胞表面仍旧保持完好的微绒毛,这可能是由于 VCR 破坏了细胞间的挤紧。Ducibella, T.<sup>[12]</sup> 1976 年研究过挤紧与细胞间连接的关系。挤紧标志着紧密连接形成的起始。在挤紧起始时,相邻分裂球的微绒毛缩回,引起相邻细胞膜的紧密合并。由此推测: VCR 可能抑制细胞间的挤紧,因而细胞间不能形成连接。

在电镜切片上还发现,脂体增多,脂体周围常围绕许多线粒体。脂体的增多可能与细胞的解毒有关,这些结果在前人实验中未见报道,尚需进一步探讨。

### 摘 要

对小鼠早期胚胎采用体外培养的方法,研究了抗癌药物硫酸长春新碱(VCR)对正常昆明小鼠早期胚胎发育的影响。临床剂量的长春新碱能使几乎所有 8 细胞胚胎死亡,无一发育至囊胚。电镜观察发现,长春新碱能使细胞核变形,还能抑制细胞之间接触和挤紧,这在临床剂量应用上也有一定的参考价值。

### 图 版 说 明

1. 倒置显微镜图片示正常的桑椹胚细胞。(400 $\times$ )
2. 倒置显微镜图片示 8 细胞胚胎在 VCR(250

$\mu\text{g}/\text{L}$ )作用下,分裂球散碎,胚胎不再发育。(400 $\times$ )

3. 电镜图片示 8 细胞胚胎在正常培养液中培养 10 h 后胞核及核仁。(5800 $\times$ )
4. 电镜图片示 8 细胞胚胎在 VCR(25  $\mu\text{g}/\text{L}$ )培养液中培养 10 h 后,核变态。(7200 $\times$ )
5. 电镜图片示 8 细胞胚胎在 VCR(25  $\mu\text{g}/\text{L}$ )中培养 10 h,细胞间并不形成连接,细胞表面伸出微绒毛。(10000 $\times$ )
6. 电镜图片示正常 8 细胞胚胎体外培养 10 h 后的脂体和网架结构(14000 $\times$ )
7. 电镜图片示 8 细胞胚胎在 VCR(25  $\mu\text{g}/\text{L}$ )中培养 10 h 后,脂体增多,脂体周围环绕线粒体。(14000 $\times$ )

### 参 考 文 献

- [1] Fellous, A. et al., *Seminars in Oncology*, 16 (suppl. 4): 9-14.
- [2] Degraeve, N., 1978, *Mutat. Res.*, 55: 31-42.
- [3] Ferm, V. H., 1963, *Science*, 141: 426.
- [4] Svoboda, K. K. and K. S. O' shea, 1984, *Teratology*, 29: 223-239.
- [5] Ungthavorn, S. and M. Joneja, 1969, *Anat. Rec.*, 163: 277.
- [6] Joneja, M. and S. Ungthavorn, 1969, *Teratology*, 2: 235-240.
- [7] Baranska, W. et. al., 1988, *Gesellschafts. Morphol. Jahrb.*, 134: 175-184.
- [8] Brinster, R. L., 1963, *Exp. Cell Res.*, 32: 205-208.
- [9] Hogan, B. and F. Costantini, 1986, In *Manipulating the mouse embryo*, ed. by Hogan, B. et al., pp. 249-252, Cold Spring Harbor, New York.
- [10] 韩贻仁、兰厚珍, 1979, 山东大学学报(自然科学版), 3: 107.
- [11] 洪涛编, 1980, 生物医学超微结构与电子显微技术, pp. 117-121, 148-153, 科学出版社.
- [12] Ducibella, T., 1976, In *Development in Mammals*, ed. by Johnson, M. H., pp. 5-30, North-Holland Amsterdam. New York and London.

**新书介绍** 申洪、沈忠英编著的《实用生物体视学技术》一书已由中山大学出版社出版。

体视学(Stereology)是由二维结构信息定量推论三维结构信息的一门新兴边缘学科,是形态定量研究的重要方法。本书概述了生物体视学基本原理测试方法及其在生物医学中的应用和平面图像定量常用参数及公式等。

本书适合所有从事生物形态定量研究和教学的科研人员、教师及研究生、大学生等参阅。对从事生物机能及生物数学等研究的专业人员也有一定参考作用。全书共 12 章, 20 万字, 定价 6.40 元, 邮费另加 0.6 元, 欲购者请将书款汇至: 广州第一军医大学病理解剖学教研室(邮编 510515), 申洪收。也可银行汇款: 第一军医大学一分户, 帐号: 0085-130-00009, 开户银行: 工商银行广州麒麟岗分理处。