

- J Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 3 (2): 161—168.
- [19] 张鉴铭等, 1990, 云南植物研究, 12 (4): 467—469.
- [20] 杨国良等, 1990, 中国食用菌, 3: 13—14.
- [21] Park, Y. D et al., 1988, *Korean J Mycol.*, 16 (1): 79—86.
- [22] Yoo, Y. B et al., 1989, *Korean J Mycol.*, 17 (3): 119—123.
- [23] 彭卫宪, 陆大京, 1987, 真菌学报, 6(3): 184—192.
- [24] Homolk, L., 1988, *Folia Microbiologia*, 33: 298—308.
- [25] Yoo, Y. B et al., 1986, *Korean J Mycol.*, 14 (1): 9—15.
- [26] 赵明亮等; 1990, 朱世瑛等主编, 食用菌新技术汇编, 大连理工大学出版社, 63—68.
- [27] Toyomasu, T et al., 1986, *Agric. Biol. Chem.*, 50: 223—225.
- [28] Yoo, Y. B et al., 1989, *Korean J Mycol.*, 17 (3): 114—118.
- [29] Alfredo M-R et al., 1986, *Mol. Gen. Genet.*, 205: 103—106.
- [30] Bininger, D. M et al., 1987, *EMBO Journal*, 6: 835—840.

哺乳类早期胚胎发育阻滞的形成与突破

李逸平 左嘉客

(中国科学院上海细胞生物学研究所 200031)

在离体培养哺乳类(包括人)着床前早期胚胎的时候, 人们都普遍地发现这样的事实: 在化学组份确定的培养基中, 早期胚胎往往不能完成从受精卵到囊胚的发育全过程, 而停顿在某个特定发育时期。我们把这种现象称作“发育阻滞(block of development)”。

早期胚胎发育阻滞的时间随种的不同而异, 例如, 小鼠和大鼠早期胚胎发育阻滞发生在2细胞期, 金黄地鼠发生在2—8细胞期, 猪发生在4细胞期, 人发生在4—8细胞期, 猕猴、牛、绵羊和山羊都发生在8—16细胞期, 兔发生在桑椹胚期^[1-8]。

近年来, 有关哺乳类早期胚胎发育阻滞机理以及突破发育阻滞方面的研究异常活跃, 各种观点纷呈。本文拟就高等哺乳动物特别是小鼠早期胚胎离体发育阻滞及其突破机理的研究近况作初步概述。

一、发生在细胞周期G₂相的事件

哺乳动物卵母细胞在成熟之前一直都停留在细胞周期的G₂/M相; 在内源激素的调节

下, 才由G₂/M相进入M相, 且停顿在M相中期。一旦遇到精子, 实现受精, 由M相跨入G₁相。随着第二极体的形成, 标志着G₁相的开始。在此期间, 源自精子的染色体发生了重大改组, 其中包括精子的鱼精蛋白(protamines)被卵母细胞的组蛋白(histones)取代等。整个合子阶段可视作胚胎发育过程的第一细胞周期。

对小鼠体内正常情况下的早期胚胎细胞周期各时相进行剖析(表1), 不难发现在最初的四个细胞周期中G₂+M相的变异性较大, 其中第一、第二细胞周期的尤为显著; 第二细胞周期的G₂+M相持续时间最长。变异大除了可能反映出作为研究材料的小鼠品系的差异性外, 更主要的是它反映了处于第一和第二细胞周期G₂相的胚胎可能对于环境压力非常敏感。有人进行过这样的试验: 在第一和第二细胞周期S相的任何时候, 将37℃的环境温度下调至20℃时, 就会导致体外培养胚胎前两个细胞周期的G₂+M相时间延长; 如果避免这种温度下降, 那么第一和第二细胞周期的G₂+

M相持续时间分别为:2—3小时和12小时^[9]。多数品系的小鼠早期胚胎置于体外培养时,其第二细胞周期的G₂相时程将无限延长,即发生所谓“2细胞阻滞(2-cell block)”的发育阻断现象^[10]。虽然人为干扰(例如将胚胎移到体外培养)很可能使第二细胞周期的G₂相时程延长,然而,即使在最适的体内条件下,它的时程也显然要比第一、第三和第四细胞周期G₂相的长。事实上,这种G₂相时程的延长与胚胎细胞内正在进行着的一系列活动有着密切的关系。

表1 小鼠胚胎最初四个细胞周期各时相的时程

细胞周期	时程(小时)		
	G ₁	S	G ₂ +M
第一周期(1细胞期)	4.5—12*	4—7	1—8
第二周期(2细胞期)	0—1.3	4—7	12—18
第三周期(4细胞期)	1—1.5	7	0.5—5
第四周期(8细胞期)	2	7	1—3

* 在大多数研究中包括了第二次减数分裂的完成。

在多数哺乳动物胚胎中,最早期的发育与胚胎基因组的大部分活动无关,而是受已经存在的母系信息调控^[11,12]。在小鼠中,从受精卵到2细胞期的中期(小鼠注射hCG之后约40小时)均为由源自母系信息调控的转录后的活动。在此期间,很少或者根本不存在RNA合成活动,而那些在卵母细胞发生期间就已转录并贮存着的mRNA却仍然参与翻译活动,去核或用转录抑制剂处理胚胎,均丝毫不影响翻译活动的正常进行^[1]。遗传的和生化的证据表明,小鼠胚胎基因组转录的激活活动最初出现在2细胞期的G₂相^[9,13],在此期间,首次出现大量非均一RNA,并且与新的多肽合成活动相吻合^[14,15];这些都证实了在胚胎细胞中发生了新的mRNA合成与翻译活动。与此同时,源自母系的mRNA失活或降解,表现为RNA总量下降,polyA的数量和平均长度降低

等^[16,16]。其它诸如核糖体装配的激活、能量代谢变化以及核仁和线粒体结构与功能趋于成熟等方面的变化也都开始于2细胞期。通过胚胎基因组的转录及蛋白质的合成活动,这些变化或活动都被调节到一定的正常范围内^[17]。

小鼠早期胚胎发育阻滞,发生在2细胞期的DNA复制之后,即在第二细胞周期的G₂相。这种发育阻滞可能与体外培养条件下发生细胞质和细胞皮层缺陷有关,在多数情况下这种缺陷将导致2细胞胚胎无法继续发育^[18]。在小鼠、猪和羊中,自发发育阻滞的高发生率往往出现在胚胎基因组激活的这段时间范围内,这同样意味着在该段时间内胚胎对于外界损害性干扰的敏感性增高^[1,18]。

人的早期胚胎的最初两个细胞周期活动也是在转录后水平上利用来自母系的发育信息进行调控的,而胚胎基因组激活起始于4细胞期的G₂相这段时间范围内,伴随着母系mRNA的失活或降解。母系mRNA的失活与胚胎基因组的激活无关,这是两件同时发生的独立事件。人胚胎发育阻滞往往就发生在第三细胞周期的G₂相^[5,9,10],这个时期与前述的小鼠、猪、羊等胚胎发生发育阻滞的时间一致,虽然所处的细胞周期不完全相同。

二、过氧化氢类物质与发育阻滞的关系

为了真正弄清楚导致哺乳动物早期胚胎体外发育阻滞的机制,人们正在不断地从胚胎内部以及外界环境中寻找原因。已经发现,损伤的细胞中含有较多的各类氧化物,包括过氧化氢以及其它自由基(例如过氧化物阴离子和羟氧根离子);因细胞分裂阻断以及细胞功能丧失所引起的异常细胞中也含有这些活性氧类物质^[19,20]。那么,在正常生理性发育阻滞的胚胎细胞中是否也含有这类活性物质呢?

通过分析小鼠卵母细胞以及早期胚胎中H₂O₂含量发现:未受精的卵母细胞中H₂O₂水平较低,1—8细胞期的早期胚胎细胞中H₂O₂水平高于以后发育期胚胎的水平。离体培养的

2细胞中期小鼠胚胎 H_2O_2 水平上升,以后高居不下^[21]。胚胎细胞内 H_2O_2 水平的上升几乎发生在第二细胞周期的长 G_2 相时期,也就是胚胎基因组激活的时期。因此,认为发育阻滞与源自 H_2O_2 的有害自由基含量上升可能有关不是没有道理的。据此,提出了活性氧能阻断正常细胞分裂的观点^[22]。

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。另外,小鼠着床前胚胎在体外发育时对氧浓度是敏感的。非生理的高氧与培养基成分或细胞作用,能导致次黄嘌呤、邻苯二胺、硫醇类以及吡啶黄等物质的生成。已知诸如次黄嘌呤类物质对胚胎正常发育有害。高氧也能影响糖原合成与其降解之间的平衡。

过氧化氢可作为各种细胞刺激和调节系统中的第二信使^[23],但是,如果其含量失控,则它就可能通过对类脂物和蛋白质的过度过氧化反应而危害细胞,导致发育阻断。

利用子宫内膜上皮细胞和成纤维细胞等作为体外培养的“饲养(feeder)”层,与早期胚胎共培养,可以在不同程度上使早期胚胎突破发育阻滞,促进正常发育^[24,25,26]。这些“饲养”层细胞能促进部分胚胎的发育,其作用机制目前还不十分清楚,有些作者认为,它们能清除培养基中对早期胚胎发育有害的物质,例如次黄嘌呤、葡萄糖、微量金属离子以及氧等^[27]。当然,这些“饲养”层体细胞或许还分泌能促进胚胎发育的有关“因子”。

三、突破发育阻滞的有关因子

尽管有关哺乳类(包括人)早期胚胎体外发育阻滞的机理以及突破这种阻滞的有效方法和机制均尚不十分清楚,但是通过近几年的不断摸索和分析,取得了一些令人鼓舞的结果,包括涉及输卵管上皮细胞合成和释放的特异性多肽,生殖道和早期胚胎自身分泌的某些生长因

子,胚胎间协同作用等方面的进展。

1. 输卵管上皮细胞合成和释放的特异性多肽

输卵管为卵的运输、受精以及早期发育提供了非常必要的环境。受精后的大多数动物胚胎,在进入子宫以前一般都已发育到桑椹期。而体外发育阻滞的出现时间恰好发生在体内早期胚胎进入子宫之前,胚胎尚处在输卵管腔中。倘若无输卵管与离体受精卵共培养,胚胎发育就趋于缓慢甚至被阻滞。倘若将小鼠受精卵置于含有输卵管的组织培养系统中培养,结果发现这些胚胎不仅没有出现阻滞,而且能顺利发育至囊胚^[28];移入羊或兔输卵管中的牛受精卵能正常发育至囊胚^[29]。这些结果均表明,不论在体内或在体外,输卵管对早期胚胎发育的影响是显著的,而且无种的特异性。

近年来,发展了输卵管上皮细胞与早期胚胎共培养技术,取得了良好的结果^[3,4,6,7,8,27]。利用猪输卵管上皮细胞或其条件培养液(conditioned medium)培养兔受精卵,可使兔胚胎顺利发育至囊胚;利用兔输卵管上皮细胞或其条件培养液共培养大鼠受精卵,也分别可使60%—90%胚胎突破2细胞阻滞,继续正常发育(作者等研究结果,待发表)。这些研究结果表明:输卵管上皮细胞合成并分泌了某些有利于胚胎正常发育所需要的信号物质,或者称其为“胚胎营养因子(embryotrophic factor)”。

在羊的输卵管上皮细胞合成并释放的蛋白质中,分离到了两类特异性多肽,其中一类具有明显的周期性分泌模式,主要由分子量分别为 92×10^3 和 46×10^3 的多肽组成,分别称作羊输卵管蛋白92和46(简称为SOP 92和SOP 46);只有在发情之后的最初4至5天内,胚胎进入输卵管时,才能检测到这两种多肽。在发情相应时间收集并培养的输卵管细胞也能分泌SOP 92和SOP 46。进一步的研究证实,SOP 92和SOP 46分别能与早期胚胎(受精卵)的透明带结合,并且能穿入透明带内,与正在发育胚胎的各个卵裂球结合^[30]。但是,作为外

源信号的这类多肽因子被早期胚胎接受之后,如何实现信号转导,如何克服发育阻滞,如何引发胚胎进一步卵裂,诸如此类的具体机制尚待进一步研究。

2. 生长因子以及早期胚胎间协同的相互影响

由输卵管上皮细胞分泌的特异性多肽以及由子宫内膜上皮等合成并释放的某些生长因子都在不同程度上具有使早期胚胎突破发育阻滞、促进正常发育的功能^[7,30-32]。然而,最近又发现在体外培养的着床前胚胎之间,存在一种协同作用(cooperative interaction),由它们自己释放的特殊的生长因子作为这种协同作用的媒介,对于早期胚胎自身的发育和生长具有十分重要的意义。

将单枚2细胞期小鼠胚胎和多枚2细胞期小鼠胚胎分别培养在微体积相同的培液中,结果,后者发育至囊胚的比率以及每个囊胚的细胞数都要高于前者;如果在单枚胚胎的培养基中添加表皮生长因子(Epidermal Growth Factor, EGF)、 α -转化生长因子(Transforming Growth Factor α , TGF- α)或 β_1 -转化生长因子(TGF- β_1),能显著改变其发育不良状况。在小鼠胚胎中,从2细胞期开始表达TGF- β_1 ,桑椹胚和囊胚表达源自血小板的生长因子A链(Platelet-derived Growth Factor A chain)以及TGF- α 。EGF的受体要在8细胞期才出现,所以在培液中添加EGF和TGF- α 对8细胞期以后的胚胎发育的作用较大^[32,33]。

在体内,胚胎分泌的生长因子迅速在生殖道内流失,尚需依赖源自生殖道上皮细胞的生长因子,以补充着床前胚胎发育之需^[33]。将早期胚胎与输卵管或子宫等上皮细胞共培养,无疑会有利于胚胎的发育,尽管其作用机制尚未真正揭开。临近着床时,子宫内膜上皮细胞合成并释放若干生长因子,包括EGF、TGF- α 、TGF- β_1 以及胰岛素类生长因子(Insulin-like Growth Factor)^[31,32],其作用引人深思。

在体外培养的早期胚胎,不仅生长缓慢,

而且所形成的囊胚中细胞数较少,这可能与培养基中缺乏源自生殖道的信号,或者由胚胎释放的自我调控因子被环境过份稀释所致。这类着床前囊胚往往不能孵化出膜。

总之,源自胚胎的和生殖道上皮的特殊因子都是以自分泌(autocrine)或旁分泌(paracrine)的作用方式,参与调控着床前胚胎正常发育以及囊胚正常形成,以保证胚胎实现正常的着床过程。

四、结束语

综上所述,有关哺乳类着床前早期胚胎发育阻滞及其突破机理的研究正方兴未艾。由于突破发育阻滞是体外培养哺乳类(包括人)早期胚胎的关键问题之一,所以近年来其研究进展较快,在如上所述的几个方面都已显露出一些端倪。今后的研究重点可能除了继续探索诸如输卵管上皮细胞等体细胞合成并释放的特殊信号物质之外,将追踪这些外源信号如何被早期胚胎接受并实现信号转导,从而引发进一步正常卵裂的有关详细机制。可以相信,随着研究的不断深入,不仅将有助于揭示涉及胚胎发育、细胞周期等具有普遍意义的基本生物学问题,同时将为体外控制卵球受精和胚胎发育提供理论依据和实际的应用技术。

摘 要

本文对有关哺乳类(包括人)着床前早期胚胎发育阻滞的形成与突破的研究近况作了概述。早期胚胎发育阻滞一般都发生在最初四个细胞周期中的某个长G₂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应该被激活的临界期,胚胎在这时对环境压力非常敏感。过氧化氢类物质在胚胎细胞内高含量累积也是导致发育阻滞的因素之一。早期胚胎的正常发育必须依赖于源自生殖道上皮细胞的信号,这类外源信号被初步认为蛋白质性质。提供某些生长因子,或清除微环境中有害物质等都将有助于

胚胎的正常发育。早期胚胎间的协同作用在体外胚胎正常发育中的正效应已引起人们的重视。

参 考 文 献

- [1] Goddard, M. J. et al., 1983, *J. Embryol. exp. Morph.*, 73: 111—133.
- [2] Bavister, B. D. 1988, *Theriogenology*, 29: 143—154.
- [3] Pampfer, S. et al., 1990, *In Vitro. Cell. Dev. Biol.*, 26: 944—948.
- [4] White, K. L. et al., 1989, *Biol. Reprod.*, 41: 425—430.
- [5] Braude, P. et al., 1988, *Nature*, 332: 459—461.
- [6] Ellington, J. E. et al., 1990, *Biol. Reprod.*, 43: 97—104.
- [7] Gandolfi, F. et al., 1987, *J. Reprod. Fert.*, 81: 23—28.
- [8] Carney, E. W. et al., 1990, *In Vitro. Cell. Dev. Biol.*, 26: 629—635.
- [9] Smith, R. K. et al., 1986, *J. Reprod. Fert.*, 76: 393—399.
- [10] Flach, G. et al., 1982, *The EMBO J.*, 1: 681—686.
- [11] Johnson, M. H. et al., 1981, *J. Embryol. exp. Morph.*, 61: 103—116.
- [12] Bolton, V. N. et al., 1984, *J. Embryol. exp. Morph.*, 79: 139—163.
- [13] Johnson, M. H. 1981 a, *Biol. Rev.* 56: 463—498.
- [14] Sawicki, J. A. et al., 1981, *Nature*, 294: 450—451.
- [15] Piko, L. et al., 1982, *Develop. Biol.*, 89: 362—378.
- [16] Clegg, K. B. et al., 1983, *Develop. Biol.*, 95: 331—341.
- [17] Piko, L. et al., 1973, *J. Cell. Biol.*, 58: 357—378.
- [18] Davidson, E. H. 1976, *Gene activity in early development*. New York, London Academic Press.
- [19] Crosby, I. M. et al., 1988, *J. Reprod. Fert.*, 82: 769—775.
- [20] Halliwell, B. 1987, *FEB Letters.*, 92: 321—326.
- [21] Aitken, R. J. et al., 1989, *Biol. Reprod.*, 41: 183—194.
- [22] Nasr-esfahani, M. H. et al., 1990, *Development*, 109: 501—507.
- [23] Oberley, L. W. et al., 1981, *Med. Hyp.*, 7: 21—42.
- [24] Laloraya, M. et al., 1989, *J. Reprod. Fert.*, 86: 583—587.
- [25] Kuzan, F. B. et al., 1982, *Anim. Sci.*, 5: 57—63.
- [26] Allen, R. L. et al., 1984, *J. Anim. Sci.* 59: 1657—1661.
- [27] Pampfer, S. et al., 1990, *In vitro. Cell. Dev. Biol.* 26: 944—948.
- [28] Biggers, J. D. 1962, *Nature*, 194: 747—749.
- [29] Boland, M. 1984, *Theriogenology*, 21: 126—137.
- [30] Gandolfi, F. et al., 1989, *Development.*, 106: 303—312.
- [31] Rappolee, D. A. et al., 1988, *Science*, 241: 1823—1825.
- [32] Huet-Hudson et al., 1990, *Mol. Endocrinol.* 4: 510—523.
- [33] Paria, B. C. et al., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 4756—4760.

上海市优秀科技期刊《科学》为双月刊，报刊
代号 4-451，欢迎读者就近向邮局办理订阅。