

大小鼠异种间嵌合胚的培养和移植

张锁链 斯琴 窦玉洁 旭日千

(呼和浩特, 内蒙古大学实验动物研究中心 010021)

已有文献指出, 异种间嵌合体动物的制作不仅能够用于研究细胞谱系及其在胚胎发育过程中的相互作用, 而且还能为研究和探索种间隔离进而培育出新的物种提供可能的技术途径^[1]。然而这项技术在作成嵌合体的过程中, 特别是在嵌合胚的培养和移植等方面仍有许多技术上的问题有待进一步探索。

本文采用聚合法(Aggregation method)使大鼠和小鼠的早期胚胎聚合为一体, 然后用含有胎牛血清(FCS)的Whitten溶液进行体外培养获得了比较高的发育率, 并把部分发育到囊胚期的大小鼠异种间嵌合胚分别移植给假孕处理的受体大鼠和受体小鼠, 均得到了着床结果。现将实验结果报告如下:

材 料 和 方 法

1. 实验动物 供胚鼠为8—13周龄的Wistar-Imamichi大鼠和ICR小鼠。受体鼠为8周龄以上未经产的同种大鼠或小鼠。供受体鼠均为本研究中心饲养的清洁级标准化实验动物。

2. 胚胎的采集 大鼠为自然排卵, 小鼠用PMSG-HCG超排处理。分别从交配后的第4, 第3天, 小鼠子宫、输卵管中采卵, 然后选出发育正常的8—16细胞期胚胎备用。

3. 嵌合胚的制作和培养 将新采集的胚胎直接放入含有0.4%PVP(聚乙烯吡咯烷酮)的台氏液(pH为2.5)或含有0.5%Pronase(链霉菌蛋白酶)的PBS溶液中除去透明带。5—10分钟后取出无透明带的胚胎, 用含有10%FCS的PBS溶液反复冲洗3次。将大、小鼠胚胎各取一枚, 用以下两种方法使两个胚胎互相靠拢并聚合为一体。一是机械压力处理法, 即在V型孔塑料培养板的小孔中滴一小滴Whitten溶液, 把聚合用的两个胚胎移入其中, 用毛细玻璃针(或吸管)使

两个胚胎互相靠拢, 然后用于培养。二是联结剂处理法, 即把聚合用的两个胚胎移入含有植物血球凝集素P(0.005 mg/ml)的Whitten溶液中, 在37℃, 5%CO₂培养箱中培养30—40分钟, 等到两个胚胎互相粘连为一体后把联结剂PHA洗净, 将胚胎继续培养。

继续培养用培养基为Whitten和PBS, 均加20%的FCS。培养时间为48小时。

4. 嵌合胚的移植和移植结果的观察 选取发育正常的囊胚期嵌合胚, 用常规手术方法分别移植给假孕第4天的大鼠和第2或第3天的小鼠的子宫角内, 每只鼠移胚8—12枚。为了提高嵌合胚的着床率, 在以大鼠为受体的部分实验中将异种间嵌合胚同正常的大鼠胚进行了对照移植, 即在同一个受体, 一侧子宫角移植嵌合胚, 另一侧子宫角移植同步发育的大鼠正常胚。

所有的移胚鼠均在胚胎移植后的第4—12天作剖腹检查, 统计移胚鼠的受胎率, 同时对胚胎的发育情况进行解剖学观察。

结 果

1. 用两种不同的聚合处理方法即机械性压力处理法和联结剂PHA处理方法, 作成的大小鼠异种间嵌合胚, 经含有20%FCS的Whitten溶液培养48小时后的发育情况如表1和图版I, 联结剂PHA处理法和机械性处理法制作的嵌合胚的聚合率分别为97.9%(48/49)和54.5%(24/44), 发育率分别为81.3%(39/48)和83.3%(20/24)。两种处理法在聚合效果上差异极显著($P < 0.01$)。

2. 把以联结剂PHA处理法作成的大小鼠异种间嵌合胚, 用两种不同的培养液即Whitten+20%FCS和PBS+20%FCS分别培养48小时后, 观察聚合胚在这两种培养液中的发育情

表 1 不同的聚合处理方法对异种间嵌合胚发育的影响

处理组	聚合处理 胚数(对)	聚合胚数 (%)	囊胚期发育* 胚数(%)
PHA 处理	49	48(97.9)*	39(81.3)
机械性处理	44	24(54.5)	20(83.3)

* 发育率是发育胚数与聚合胚数之比

* $P < 0.01$

况。结果如表 2, 在 Whitten 溶液中有 80.8% (42/52) 的嵌合胚发育为外形正常的囊胚期胚胎, 发育率明显高于 PBS 组的 48.8% (20/41)。

表 2 不同培养基对异种间嵌合胚发育的影响

培养液	培养胚数	发育胚数(%)
Whitten + FCS	52	42(80.8)*
PBS + FCS	41	20(48.8)

* $P < 0.01$

3. 聚合胚培养 24 小时后, 选取发育为囊胚期的胚胎进行移植, 剖腹检查结果如表 3—5 所示: ① 以大鼠为受体的妊娠率和移植胚胎的着床率分别为 100% (7/7) 和 51.3% (40/78), 以小鼠为受体的分别为 87.5% (14/16) 和 53.7% (65/121)。其妊娠率和移植胚胎的着床率在两种不同的受体之间没有显著差异。② 以大鼠为受体, 胚胎移植后第 8 天(相当于妊娠第 12 天)观察的 4 枚嵌合胚胎中, 只有 1 枚发育正常、体长为 12 mm, 而另外 3 枚胚胎均为退化胚(颜色发黑、无弹性、个体小)。移植后第 10—12 天共检查 22 枚胚胎, 结果全部为退化胚。③ 以小鼠为受体, 胚胎移植后第 7 天(相当于妊娠第 10 天)观察的 10 枚胚胎中, 6 枚为发育正常的胚胎, 平均长度为 4.5 mm, 其余 4 枚为退化胚。在移植后第 8—10 天检查的 26 枚胚胎中没有 1 枚是正常胚, 均为退化胚。

4. 把以本研究方法作成的大小鼠异种间嵌合胚与同期大鼠自然交配的正常胚进行对照移植, 结果如表 6—7; ① 嵌合胚和正常胚的

表 3 异种间嵌合胚的移植结果

受体	受体数	移胚数	妊娠鼠数 (%)	床胚数 (%)
大鼠	7	78	7(100)	40(51.3)
小鼠	16	121	14(87.5)	65(53.7)

表 4 异种间嵌合胚移植给受体大鼠后的发育情况

检查*	检查胚(平均长度 mm)		
	合计	正常胚	退化胚
4	9	9(3.2)	0
6	4	4(7.0)	0
8	4	1(12.0)	3(3.0)
10	2	0	2(5.5)
11	7	0	7(5.5)
12	13	0	13(5.3)

* 胚胎移植当日为第 0 天。

表 5 异种间嵌合胚移植给受体小鼠的发育情况

检查*时间	检查胚数(平均长度 mm)		
	合计	正常胚	退化胚
4	4	4(3.0)	0
5	3	2(4.0)	1(1.0)
6	7	6(4.2)	1(2.0)
7	10	6(4.5)	4(3.1)
8	13	0	13(3.7)
9	3	0	2(4.0)
10	10	0	10(1.0)

* 胚胎移植当日为第 0 天。

表 6 异种间嵌合胚与同期大鼠正常胚在假孕大鼠的着床率

移植胚胎	移植胚数*	着床胚数(%)
异种间嵌合胚	47	20(42.6)
大鼠正常胚	38	25(65.8)*

* 移植给 8 只受体大鼠的胚胎总数。* $P < 0.05$ 。

移植后的着床率分别为 42.6% (20/42) 和 65.8% (25/38), 前者明显低于后者。② 着床的 20 枚嵌合胚中, 有 11 枚为正常发育的胚胎, 其余的均为退化胚。但在着床的 25 枚正常大鼠胚中, 有 17 枚为正常胚。其中 4 枚则

表7 异种间嵌合胚与同期大鼠正常胚移植后发育情况的对照表

检查* 时间	胚胎区别	检查胚数(平均长度 mm)		
		合计	正常胚	退化胚
6	嵌合胚	4	3(5.0)	1(2.0)
	正常胚	1	1(6.0)	
7	嵌合胚	1	1(9.0)	
	正常胚	5	5(8.0)	
8	嵌合胚	6	6(8.0)	
	正常胚	5	5(11.0)	
10	嵌合胚	5	1(13.0)	4(4.0)
	正常胚	5	1(10.0)	4(3.0)
11	嵌合胚	2	0	2(4.0)
	正常胚	4	1(16.0)	3(4.0)
12	嵌合胚	2	0	2(3.0)
	正常胚	5	4(18.0)	1(6.0)

* 胚胎移植当日为第0天。

已经发育到移胚后的第12天(即妊娠第16天),并且已具胎儿雏形(版图1—4)。

讨 论

1. 从本研究的结果可以看出, Tarkowski 和 Mintz 在鼠嵌合胚实验中确立的聚合法^[2,3], 同样适合于大鼠、小鼠异种间嵌合胚的制作。实验所用的培养板孔底是“V”型底, 使用不加联结剂的培养液, 也能使两个胚胎互相靠拢而聚合。但从表1的结果来看, 如果在培养液中加入 0.005 mg/ml PHA, 其联结效果显著提高。胚胎聚合率可达 97.9%。

2. 胚胎的培养是制作大小鼠异种间嵌合胚的重要环节。Stern 用含 50% FCS 的 BWB 溶液作嵌合胚的培养基, 曾得到 27.0% 的囊胚^[4]。日本的高桥文明改用 PBS, 结果使其发育率提高到 82.9%^[5]。我们在本研究的预备实验中曾用了不同的培养液 PBS、KRB、BWB 和 Whitten, 分别培养了大鼠和小鼠的 8—16 细胞期胚胎, 结果 Whitten 溶液培养的大、小鼠的胚胎发育率都很高。实验中也证明了 Whitten 培养液适合于大小鼠异种间嵌合胚的体外培养, 有 80% 的嵌合胚能够发育为囊胚期胚胎。

3. Tachi 等通过电镜观察发现大鼠由来的细胞和小鼠由来的细胞, 在嵌合胚中均能分化为内细胞团以及滋养层细胞, 但是有倾向性, 大鼠由来的细胞更多地构成侧壁滋养层细胞, 而小鼠由来的细胞更多地构成为内细胞团^[6]。他们指出, 用聚合法制成的大小鼠异种间嵌合胚, 即使移植到小鼠子宫内, 也不能继续发育, 并认为这可能是大鼠滋养层细胞与小鼠子宫间存在着某些不适合因素所致。

本文虽然未作电镜观察, 但从移植实验的结果来看, 无论是小鼠为受体, 还是用大鼠为受体, 这种嵌合胚均能着床, 着床率在大鼠和小鼠分别为 51.3% 和 53.7%。着床后的胚胎一般能维持到妊娠第 10 天, 平均体长在小鼠和大鼠分别为 4.5 mm 和 7.0 mm。在受体小鼠中有一枚嵌合胚发育到相当于小鼠正常妊娠 8 天的神经轴胚期胚。但是自妊娠第 12 天以后的胚胎, 无论是在小鼠还是在大鼠均为退化胚。大鼠正常胚胎对照移植的实验结果(表 6) 也说明, 在同一个受体条件下, 一侧子宫角的大鼠胚胎能够正常发育, 但另一侧移植的异种间嵌合胚则只能维持到妊娠第 10 天左右, 此后开始退化。上述结果表明, 用聚合法作成的大小鼠异种间嵌合胚无论移植给构成嵌合胚的哪一方动物, 均能着床, 并且维持到妊娠后第 10 天左右才开始退化。这一结果与 Tarkowski 用大鼠和小鼠相互进行早期胚移植的结果基本一致^[7]。他把大鼠 2—8 细胞期的早期胚胎, 移植到小鼠输卵管内, 移植后约 6 天(妊娠第 9 天), 在子宫内看到着床发育的胚胎。而把小鼠早期胚移植到大鼠输卵管内, 同样在移植后约 6 天看到着床胚胎。此后, 很快退化、死亡。这两个实验结果的一致性, 似乎给我们提示, 在受体(大鼠或小鼠)子宫里的异种胚或异种间嵌合胚的着床后退化, 很可能与细胞免疫以外的因素有关系。

摘 要

本研究观察了大小鼠异种间嵌合胚在体外

培养条件下以及移植后的发育情况。采用聚合法使 Wistar-Imamichi 大鼠和 ICR 小鼠的早期胚胎聚合为一体,然后用于体外培养,并进行移植。实验结果表明,大小鼠异种间嵌合胚在含 20%FCS 的 Whitten 溶液中有 80.8% 的胚可发育为囊胚期胚胎。这种胚胎在受体大鼠和小鼠,均能着床,着床率分别为 51.3% 和 53.7%,没有显著差异。着床后的胚胎能够维持到妊娠第 10 天左右,但以后很快退化、死亡,其原因有待进一步探索。

参 考 文 献

[1] Lulie Ann Miller, 1984, *Bioscience*, Vol.

34, No 5, 290.

[2] Tarkowski, A. K., 1961, *Nature*, 190, 857—860.

[3] Mintz, B., 1964, *J. Exp. Zool.*, 157:85—100, 273—292.

[4] Stern M. S., 1973, *Nature*, Vol. 243, June, 22, 472—473.

[5] 高桥文明,藤代克彦等,1986,哺乳卵研志, Vol. 3 No 2 73—77.

[6] Tachi, S., Tachi, C., 1980, *Develop. Biol.* 80, 18—27.

[7] Tarkowski, A. K., 1962, *J. Embryol. Morphol.* 10, 476—495.

人胎肝细胞裂解液对照射小鼠多能造血干细胞的影响

史剑慧 程文英 王建平 徐萍 丁志圣 罗伟华 莫素珍

(上海医科大学放射医学研究所 200032)

在胎肝移植输注中,人们已经注意到除造血细胞对患者造血功能的支持和替代外,还有造血刺激因子的作用。本文采用内、外源脾结节测定法和流式细胞术,观察了人胎肝细胞经反复冻融裂解后的胎肝细胞裂解液(fetal liver lysate, FLL)及其洗脱峰组分对受照小鼠多能造血干细胞的影响,为胎肝移植有效作用机理提供实验依据。

材 料 和 方 法

1. 动物及照射条件 10—12 周龄的 BALB/C 及 ICR 雄性小鼠,体重 24 ± 2.5 g; ^{60}Co γ 射线,照射距离 80 cm,剂量率 1.0 Gy/min。

2. FLL 制备及分离 从妊娠 4—5 月的水囊引产胎儿中无菌取出肝脏,制成单细胞悬液,以生理盐水洗涤后调整细胞浓度为 1×10^7 个细胞/ml,反复冻融破碎细胞,4℃ $22500 \times g$ 离心,20 min,取上清液,此即为 FLL。经 Sephacryl S-300 凝胶柱(瑞典 Pharmacia 生产)过滤洗脱 FLL,以 280 nm 紫外分光光度法及 Hartree 酚试剂检测 FLL 洗脱液组分的蛋白含量,并经聚丙烯酰胺凝胶电泳确定各洗脱峰的分子量范

围。

3. 外源性脾结节测定 经 6 Gy 照射的供体小鼠于照后 24 h 腹腔注射 FLL 1 ml/鼠,并将其照后 3、7、10 和 15 天之股骨骨髓,由尾静脉输注至经 8 Gy 照射的受体小鼠,按 Till 和 McCulloch 法进行脾结节(又称脾结节生成单位,CFU-S)测定。

4. 内源性脾结节测定及细胞周期分布分析 经 7.5 Gy 照射的小鼠于照后 24 h 腹腔注射 FLL 或各峰组分 1 ml/鼠,于照后 9 天杀鼠取脾,计数脾凸面的结节数;然后切取脾结节,以 PBS 制成单细胞悬液,洗涤后乙醇固定。取细胞 1×10^6 /管,洗涤后加入 RNase 40 u/管,37℃ 温育 30 min,然后加 PI 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$,在流式细胞仪 FACS TAR PLUS 上进行细胞周期分析。本实验细胞变异系数(CV)值为 $5.66 \pm 0.9\%$ 。

结 果

1. 层析后的 FLL 各峰组分蛋白含量和分子量范围 层析 FLL 可以得到 5 个峰蛋白组分,以峰 4、峰 5 的蛋白含量为最低,分子量也最小(表 1)。