

昆明小鼠卵子的体外受精及发育的研究

鹿也非 旭日千

(内蒙古大学实验动物研究中心)

关于小鼠体外受精的研究最早是由 Whittingham 于 1968 年首先获得了产仔的结果^[1]。在此之后又有许多人进行了深入的研究,为小鼠以及哺乳动物的体外受精提供了大量实验依据^[2-4]。但这些研究基本上是以 ICR 品系小鼠为材料进行的。本研究的目的在于探讨适合于昆明小鼠卵子体外受精与发育的培养液及其添加物,对受精过程中受精卵的形态变化进行仔细观察,并将培养得到的胚胎移植给受体雌鼠以检验其发育能力,从而建立一套适合于昆明小鼠的稳定有效的体外受精及体外培养系统。

材 料 和 方 法

一、精子、卵子的准备及体外受精

精子采自体重为 40—45 克的 10 周龄以上成熟雄鼠。方法是将雄鼠以颈椎脱臼法处死后用灭菌玻璃针从附睾尾部挑取一小滴浓密精液,放入液体石蜡覆盖下的 0.2 ml TYH 培养液^[5]微小滴中,于 37℃, 5% CO₂, 95% 空气条件下的 CO₂ 培养箱(日本三洋 MCO-325 T)内进行获能培养 1—1.5 小时,并利用血球计数板计算出该精子悬液的浓度。

卵子采自体重为 30—40 克的 8 周龄以上成熟雌鼠。方法是腹腔注射 PMSG (卫生部长春生物制品研究所) 5—7.5 iu, 48 小时后腹腔注射 hCG (宁波激素制品厂) 5—7.5 iu。hCG 注射后 12—16 小时将雌鼠处死后取出输卵管,在立体显微镜下用解剖针挑破其膨大部,将卵块引入 TYH 培养液的微小滴中,于 CO₂ 培养箱中培养。

当精子的获能培养结束时,根据计算出的精子浓度,用经过灭菌的微量移液管吸取适量精子悬液,缓慢加入含有卵子的 0.2 ml 微小滴中,使小滴中精子浓度保持在 $0.5—0.7 \times 10^6/\text{ml}$ 。计算方法为:应取精子

$$\text{悬液的量} = \frac{\text{含卵子微小滴体积} \times \text{受精时最终浓度}}{\text{精子悬液浓度} - \text{受精时最终浓度}}$$

然后进行 6—8 小时的受精培养,以使其完成体外受精过程。

如果进行卵子受精情况的检查,须在授精后适当的时间将卵子制成整体标本,以 10% 中性福尔马林固定后用 0.1% 兰间苯二酚染色,在相差显微镜下检查受精结果。

二、体外受精卵的培养

本研究所使用的发育用培养液为 Whitten 培养液^[6]。但其中的牛血清蛋白(BSA)的含量由原配方的 1 mg/ml 提高至 4 mg/ml。在受精卵的发育培养时,需要以小鼠输卵管上皮或卵丘细胞进行共同培养(co-culture),具体制备方法如下:

输卵管上皮的制备 在采集卵子的同时,用一锋利的切割刀片(自制)将输卵管膨大部切下,并将其纵向切开,使其上皮细胞层向外翻出,然后移入另一个微小滴中培养以用于受精卵的发育培养。

卵丘细胞的准备 在受精培养结束时(授精后 6—8 小时),用吸管收集卵子周围脱落的卵丘细胞(尽量避免吸入死精子),用 Whitten 培养液洗一遍后,即可用于受精卵的共同培养。

与此同时,在立体显微镜下将形态正常的卵子选出,以 Whitten 培养液洗两遍后移入发育用培养液进行培养(包括单独培养与共同培养)。培养条件与受精培养时相同,并分别于授精后的 24、48、72 和 96 小时检查发育情况。

三、体外受精卵的移植

选用 8—10 周龄的昆明品系雌鼠作为受体鼠。以结扎雄鼠进行假孕处理的第二天检查阴道栓,并把当日作为假孕的第一天。胚胎的移植于假孕的第三或第四天进行。移植时将雌鼠麻醉后在背部开口,将子宫角牵引出来后用牙科针头在子宫角上刺一小的开口,将体外培养 72—96 小时的桑椹胚或囊胚在 Whitten 培养液中洗三遍后用玻璃微吸管将胚胎通过子宫角上的开口轻轻移入子宫腔中,迅速缝合刀口。待鼠苏醒后放回饲养室。超期而未产的雌鼠须处死解剖后检查子

本研究得到了张锁铤讲师、斯琴同志以及内蒙古大学实验动物研究中心全体同志的大力协助,在此表示衷心的感谢。

宫内壁有无着床点, 以判定所移胚胎是否曾经着床。

结 果

一、受精结果及受精后精子、卵子的形态变化

授精后 9.5 小时将卵子制成标本镜检, 四次实验观察到精子穿入卵子的平均百分率为 74.6%(62.6—95.8%)。其中单精子穿入卵占 92.2%(表 1)。

为了搞清授精后培养时间与受精率的关系, 我们分别于授精后 0.5、1、2、3、4、10 和 15 小时检查了受精情况, 其结果如表 2 所示。授精后仅 0.5 小时, 就有 38.9% 的卵子发生了精子的穿入, 而授精后 1 小时达到 78.6%。随着培养时间的延长, 穿入卵子的比例趋于增加。10 小时受精卵的比例达到 96.3%。另外, 多精子穿入的现象从 1 小时起开始出现, 随着培养时间的延长, 其比例也逐渐增多。

表 1 以 TYH 为受精用培养基进行的 4 次重复实验的受精结果

实验次数	检卵总数	精子穿入卵子(%)			
		合 计	单精子穿入卵	多精子穿入卵	异常卵(%)
1	42	33(78.6)	25(75.8)	8(24.2)	1(2.4)
2	91	57(62.6)	56(98.2)	1(1.8)	4(4.4)
3	24	17(70.8)	17(100)	0(0)	0(0)
4	48	46(95.8)	43(93.5)	3(6.5)	1(2.1)
合 计	205	153(74.6)	141(92.2)	12(7.8)	6(2.9)

培养时间为 9.5 小时

表 2 授精后培养时间与受精率的关系

授精后培养 时间(h)*	检查卵 子总数	精子穿入卵子(%)			异常卵(%)
		合 计	单精子穿入卵	多精子穿入卵	
0.5	36	14(38.9)	14(100)	0(0)	0(0)
1	42	33(78.6)	28(84.8)	5(15.2)	0(0)
2	39	26(66.7)	20(76.9)	6(23.1)	5(12.8)
3	40	27(67.5)	11(40.7)	16(59.3)	8(20.0)
4	34	27(79.4)	12(44.4)	15(55.6)	3(8.8)
10	27	26(96.3)	17(65.4)	9(34.6)	0(0)
15	19	18(94.7)	3(16.7)	15(83.3)	1(5.3)

* 以 TYH 为受精用培养基进行的 4 次实验的合计。

表 3 穿入精子头部的形态变化与授精后培养时间的关系

授精后培养 时间(h)*	检查卵 子总数	精子穿入卵子(%)			
		合 计	膨大前期	膨大期	原核期
0.5	36	8(22.2)	8(100)	0(0)	0(0)
1	42	29(69.0)	9(31.0)	20(69.0)	0(0)
2	34	26(76.5)	1(3.8)	25(96.2)	0(0)
3	31	26(83.9)	0(0)	26(100)	0(0)
4	30	26(86.7)	0(0)	17(65.4)	9(34.6)
6	30	21(70.0)	0(0)	1(4.8)	20(95.2)
10	27	26(96.3)	0(0)	0(0)	26(100)
15	18	18(100)	0(0)	0(0)	18(100)

* 以 TYH 为受精用培养基进行的 4 次实验的合计。

表 4 精子穿入卵子后卵细胞核的形态学变化与授精后培养时间的关系

授精后培养 时间(h)*	检查卵 子总数	精子穿入卵子(%)				
		合 计	M II 期	A II 期	T II 期	原核期
0.5	36	8(22.2)	8(100)	0(0)	0(0)	0(0)
1	42	29(69.0)	6(20.7)	23(79.3)	0(0)	0(0)
2	34	26(76.5)	1(3.8)	6(23.1)	19(73.1)	0(0)
3	31	26(83.9)	0(0)	0(0)	26(100)	0(0)
4	30	26(86.7)	1(3.8)	1(3.8)	9(34.6)	15(57.7)
6	30	21(70.0)	0(0)	0(0)	1(4.8)	20(95.2)
10	27	26(96.3)	0(0)	0(0)	0(0)	26(100)
15	18	18(100)	0(0)	0(0)	0(0)	18(100)

* 以 TYH 为受精用培养基进行的 4 次实验的合计。

在实验中我们还对受精过程中雌、雄配子的形态变化进行了连续观察, 结果见表 3 和表 4。授精后 1 小时和 2 小时, 穿入精子头部处于膨大期的受精卵比例分别为 69.0% 和 96.2%, 并于 2 至 3 小时达到高峰。而在授精后 1 小时, 活化卵子的比例已达到 79.3%, 处于 A II 期; 授精后 3 小时, 100% 的卵子均处于 T II 期。授精后 6 小时, 95.2% 的受精卵已发育至原核期。10—15 小时, 原核均呈现为膨大状态。

从卵子核的形态来看, 非活化状态的卵子核均处于 M II 期, 染色体排列为赤道板; 授精后到 A II 期时, 染色体分开移向两极; 2 至 3 小时到 T II 期时, 一侧的染色体移向受精卵的边缘, 表现为排出第二极体。原核期时, 可观察到卵周隙中有两个明显的极体。

对受精后穿入的精子头部以及卵子染色体的形态变化进行的连续观察表明, 在授精后仅 10 分钟, 卵子周围便围绕了大量的精子(图版 I 图 1)。授精后半小时, 有部分精子已经穿入了透明带或卵细胞质(图版 I 图 2)。穿入精子的头部随后开始膨大, 并由镰刀形变为椭圆形或不规则形。较为致密的精子头部开始变得疏松, 轮廓模糊不清, 着色变浅, 甚至只能观察到顶体附近的结构。在此之后, 精子的头部又出现了浓缩现象, 染色变深(图版 I 图 3)。在以前的有关受精时形态变化的研究中未见到有这样的描述^[7]。而伴随这一过程的是卵子的活化, 表现为第二次减数分裂的完成(M II—T II)

和第二极体的排出。雌、雄原核于 4—6 小时形成后(图版 I 图 4), 有一个雌、雄原核同时发生膨大的过程, 同时伴有核膜不易看清, 核质着色变浅等现象, 且雌、雄原核靠近并趋于融合(图版 I 图 5)。

二、体外受精卵的发育培养结果

选用 Whitten 培养液(WM), 添加 $100 \mu\text{mol/L}$ 的 EDTA(乙二胺四乙酸, 日本和光纯药)以作为基本培养液, 并在此基础上另外分别添加小鼠输卵管上皮或卵丘细胞与胚胎共同培养, 以考察这三种方法的培养效果。其结果见表 5。授精后 24 小时, 三个处理组的 2 细胞发育率分别为 54.8%, 59.8% 和 61.6%; 培养至授精后 48 小时, 发育为 4 细胞胚胎的比例分别为前者的 16.3%, 74.7% 和 88.9%, 后两者与对照组(WM + EDTA)的结果相比具有极显著的差异($P < 0.01$)。将这些胚胎继续培养至授精后 72 小时, 后两个处理组中分别有 72.3% 和 69.9% 的胚胎发育为桑椹胚, 而对照组(WM + EDTA)中的胚胎则未能继续发育, 表现为“2 细胞阻滞”现象。

为检验 EDTA 对培养小鼠体外受精卵发育过程的影响, 采用在 WM 中只添加小鼠输卵管上皮与在 WM 中添加 EDTA 和小鼠输卵管上皮的培养法进行对照实验。结果表明, 在培养至授精后 72 至 96 小时后, 前者与后者发育为桑椹胚和囊胚的比例分别为 29.5% 和 67.9%, 具有极显著的差异($P < 0.01$)。(见表 6)

表 5 发育用培养基(WM)内输卵管上皮或卵丘细胞的添加与否对小鼠 IVF 卵发育的影响

培养条件	培养 卵子数	发育卵子数(%)						
		授精后 24 小时			授精后 48 小时		授精后 72 小时	
		2 细胞胚	合计	2 细胞胚	4 细胞胚	合计	2—8 细胞胚	桑椹胚
WM + EDTA	157	86(54.8)	80(51.0)	67(83.8)	13(16.3) ^a	47(29.9)	47(100.0)	0(0) ^e
WM + EDTA + 小鼠输卵管 上皮	164	98(59.8)	99(60.4)	25(25.3)	74(74.7) ^b	83(50.6)	23(27.7)	60(72.3) ^c
WM + EDTA + 小鼠卵丘 细胞	198	122(61.6)	117(59.1)	13(11.1)	104(88.9) ^c	113(57.1)	34(30.1)	79(69.9) ^f

a < b, c(p < 0.01)($\chi^2 = 22.79$)
d < e, f(p < 0.01)($\chi^2 = 28.89$)

表 6 EDTA 的添加与否对小鼠 IVF 卵发育的影响

培养条件	培养 卵子数	发育卵子数(%)						
		授精后 24 小时		授精后 48 小时		授精后 72 小时		
		2 细胞胚	合计	2 细胞胚	4 细胞胚	合计	2—8 细胞胚	桑椹胚
WM + 小鼠输卵管 上皮	252	109(43.3)	141(56.0)	88(62.4)	53(37.6)	112(44.4)	79(70.5)	33(29.5)
WM + 小鼠输卵管 上皮 + EDTA	211	108(51.2)	117(55.5)	41(35.0)	76(65.0)	109(51.7)	35(32.1)	74(67.9) [*]

* $\chi^2 = 21.01$ P < 0.01

在此基础上, 我们选用 WM + EDTA + 小鼠输卵管上皮的方法进行了受精卵的扩大培养。6 次实验的结果表明, 授精后 24 小时, 有 56.01% 的培养卵子发育至 2 细胞期; 继续培养至 72—96 小时, 有 74.12% 的 2 细胞胚胎发育为桑椹胚和囊胚(见表 7 及图版 II 图 6—9)。另外, 培养中在镜下可观察到小鼠输卵管上皮呈现出旺盛生长的大空泡状(图版 II 图 10), 以

表 7 小鼠 IVF 卵在发育用培养基(WM + EDTA + 小鼠输卵管上皮)内的发育情况

检查卵数	发育卵子数(%)		
	授精后 24 小时		授精后 72—96 小时
	2 细胞胚	2—4 细胞胚	桑椹胚—囊胚
607	340(56.01)	88(25.88)	252(74.12)

为六次实验结果的总和

及表面纤毛的急速摆动。培养结果表明, 以这一方法建立的昆明小鼠体外受精卵的培养系统是稳定有效的, 对于克服其胚胎的“2 细胞阻滞”现象, 促进胚胎的发育, 具有明显的效果。

三、体外受精卵的移植结果

为了检测其正常发育能力, 将 105 枚经培养得到的体外受精植入前胚胎(包括桑椹胚和囊胚)分别移植给 10 只受体雌鼠, 其中 2 只雌

表 8 小鼠体外受精胚胎的移植结果

受体数	受体鼠 假孕天数	移植胚 发育阶段	移 胚 数	移植结果		
				着床胚数 (%)	产仔数	吸收 胚数
5	3	桑椹胚	5	13(27.1)	7	6
		囊胚	43			
5	4	桑椹胚	16	4(7.0)	0	4
		囊胚	41			

鼠于假孕后第 21 天分别产仔 2 只和 5 只,其中雄性 4 只雌性 2 只。另有 1 只出生后被雌鼠吃掉,性别不明(图版 II 图 11)。结果见表 8。

讨 论

有关小鼠体外受精的研究,丰田裕等^[5]以 TYH 培养液进行了 ICR 品系小鼠附睾精子的体外获能和受精的实验,得到了 92.7% 的受精率。Hoppe 和 Pitts^[8]的研究得到的受精率为 92%。尹海林等^[9]在昆明小鼠的体外受精研究中以 2 细胞胚的出现作为受精的标准,得到了 78.1% 的受精率。本研究对昆明小鼠的体外受精进行了系统的研究,得到了 62.6—95.8% 的受精率,与其他研究者的结果是相似的。

受精实验中发现,处于精子头部膨大期的受精卵比例于授精后 3 小时达到高峰,而于 4 至 6 小时趋于减少。在这一持续较长时间的发育阶段中,处于 A II 期和 T II 期的受精卵比例则相继迅速上升,形成各自的高峰期;雌、雄原核的形成也是高度同步的。由此可见,雌、雄配子结合后各自的形态变化是相互关联的。但两者之间是否存在相互制约的机制还不清楚。

昆明小鼠是我国目前使用最广的一种远交品系小鼠^[10]。其早期胚胎与 ICR 小鼠的早期胚胎一样,在培养中也表现出严重的“2 细胞阻滞”现象。但 ICR 小鼠胚胎的发育阻滞可通过向培养液中添加 EDTA 而得到有效地克服^[11]。据报道,金黄地鼠、大鼠以及许多远交品系小鼠的 2 细胞胚胎在体外培养时都发生阻滞现象^[12,13]。而牛的胚胎在培养时通常也在 8 细胞期停止发育^[14]。一些研究者采用将胚胎与体细胞或生殖道上皮细胞共同培养的方法来克服这一现象。这些细胞的种类有:成纤维细胞^[15],子宫内膜细胞^[16],输卵管上皮^[17]以及卵丘细胞^[18]和黄体细胞^[19]等,都获得了一定的效果。

Minami 等人曾利用器官培养系统,将金黄地鼠的 2 细胞胚胎移入离体培养的小鼠输卵

管中,得到了 21% 的囊胚发育率^[20]。而在本研究中是将切开的小鼠输卵管浸于含有胚胎的培养液中培养发育的。实验结果证明,如果条件适合,小鼠输卵管也可以浸于一定的培养液内进行培养,而且能释放出某种物质,通过培养液作用于胚胎并能促进其发育。向培养液中添加 EDTA 未能有效地克服胚胎的发育阻滞,而培养液中只添加输卵管上皮也仅有 29.5% 的胚胎发育至桑椹胚,说明昆明小鼠胚胎的阻滞机理是与 ICR 品系有所不同的。而共同培养时 EDTA 和输卵管分泌物的协同作用机理以及后者的化学本质,还需要进一步的实验加以研究。

将利用这一培养系统得到的植入前胚胎移植给受体雌鼠后得到了产仔的结果,说明该培养系统能够满足胚胎发育的营养需求,并能维持部分胚胎的正常生存。从移植的结果来看,于假孕第 3 天移植给受体的胚胎的着床率要高于第 4 天所移胚胎,这与 Suzuki 等^[21]和 Hoppe 等^[8]得到的结果是相吻合的。他们也是将胚胎移植给晚一天进行假孕处理的受体雌鼠而得到了相对较高的受胎率的。

由于实验中移植的胚胎不多,所用的受体雌鼠也很有限,再加上移植技术以及胚胎选择等因素的影响,使得本研究的受胎率偏低。因此只能从中得出一些初步的结论。至于其他一些影响移植结果的因素,则需要更多的实验加以确定。

摘 要

为建立稳定有效的昆明小鼠卵子的体外受精和体外培养系统,研究中以成熟雄鼠附睾尾部精子与超排得到的卵子在 TYH 培养液中进行体外受精,并对精子的穿入情况以及受精卵中精子头部及卵细胞核的形态变化进行了连续观察。将小鼠输卵管上皮或卵丘细胞加至培养液中与受精卵共同培养,克服了“2 细胞阻滞”现象,分别有 72.3% 和 69.9% 的胚胎发育为桑椹胚。将培养得到的桑椹胚和囊胚移植给受体雌鼠后,得到了产仔的结果。证明本研究建

立的昆明小鼠卵子的体外受精和培养系统是可行的。

图版说明

图版 I

1. 授精后 10 分钟, 大量的精子附着在卵子表面。
×100
2. 授精后 0.5 小时, 精子已穿入卵子内(箭头所示)。
×1000
3. 授精后 2 小时, 穿入的精子头部膨大, 与尾部分离(箭头所示) ×1000
4. 授精后 4 小时, 形成的雌、雄原核以及精子尾部。
×400
5. 授精后 15 小时, 雌、雄原核开始融合。×400

图版 II

6. 培养 24 小时形成的 2 细胞胚胎。×200
7. 培养 48 小时形成的 4 细胞胚胎。×100
8. 培养 72 小时形成的桑椹胚。×100
9. 培养 96 小时形成的囊胚。×100
10. 培养中的小鼠输卵管上皮及发育的囊胚。×40
11. 受体雌鼠及其 4 只“试管小鼠”。

参考文献

- [1] Whittingham, D. G., 1968, *Nature*, 220: 592—593.
- [2] Cross, P. C. and R. L. Brinster, 1970, *Biol. Reprod.*, 3: 298—307.
- [3] Mukherjee, A. B. and M. M. Cohen, 1970,

Nature, 228: 472—473.

- [4] Kaufman, M. H. and D. G. Whittingham, 1972, *J. Reprod Fert.*, 28: 465—468.
- [5] 丰田裕等, 1971, (日)家畜繁殖志, 16(4): 147—157.
- [6] Whitten, W. K., 1971, *Adv. of Biosci. Raspe., G., ed.*, 6:129. Pergamon Press
- [7] 曲漱惠, 1980, 动物胚胎学, pp 30—37, 高等教育出版社。
- [8] Hoppe, P. C. and S. Pitts, 1973, *Biol. Reprod.*, 8: 420—426.
- [9] 尹海林, 陈秀兰, 1989, 遗传, 11(3): 18—22.
- [10] 钟品仁, 1983, 哺乳类实验动物, pp 163—170, 人民卫生出版社。
- [11] 星雅树, 丰田裕, 1985, (日)日畜会报, 56(12): 931—937.
- [12] Yanagimachi, R. and M. C. Chang, 1964, *J. Exp. Zool.*, 156: 361—376.
- [13] Whittingham, D. G., 1975, *The Early Development of Mammals*, pp 1—24, Cambr. Univ. Press U. K.
- [14] Wright, R. J. and K. R. Bondioli, 1981, *J. Anim. Sci.*, 53: 702—728.
- [15] Kuzan, F. B. and R. W. Wright, Jr., 1982, *Anim. Reprod. Sci.* 5: 57—63.
- [16] Allen, R. L. and R. W. Wright, Jr., 1984, *J. Anim. Sci.* 59: 1657—1661.
- [17] Eyestone, W. H. et al., 1987, *Theriogenology*, 27: 228(Abstr.)
- [18] Goto, K. et al., 1988, *J. Reprod. Fert.*, 83: 753—758.
- [19] Xie, S. et al., 1987, *Theriogenology*, 27: 296(Abstr.)
- [20] Minami, N. et al., 1988, *Gamete Res.*, 19: 235—240.
- [21] Suzuki, H. and Y. Toyoda, 1986, *J. Mamm. Ova Res.*, 3(2): 78—85.

甲₂ 巨球蛋白对辐照细胞的保护效应

何介薇 高素梅

(上海医科大学放射医学研究所)

甲₂ 巨球蛋白(α_2M)是机体内一种广谱的蛋白酶抑制剂, 曾报道它具有抗辐射损伤作用^[1]。临床上应用人血 α_2M 制剂治疗急慢性

放射性皮肤粘膜溃疡已获得满意的效果^[2]。为了进一步探索 α_2M 保护辐射损伤的有效机理, 我们采用 ³H-胸腺嘧啶核苷(³H-TdR)掺入方