

同剂量 LPS 的反应特点, 决定了内毒素、败血症、感染性休克时循环血中 TNF 变化的不同动力学过程。当然, 这一假设尚需要更为深入和系统的研究来加以证实。

摘 要

本实验观察了不同剂量 LPS 诱导大鼠肝 Kupffer 细胞释放 TNF 的作用。加入 LPS 后 1 小时, 三种剂量 LPS 组 Kupffer 细胞培养上清中均可测到 TNF 活性, 3 小时达到峰值。100 和 150 ng/ml LPS 组 TNF 活性高于 50 ng/ml 组 ($P < 0.01$), 而 100 和 150 ng/ml 两组之间无明显差异 ($P > 0.05$)。再次加入 LPS (终浓度 100 ng/ml), 只有 50 ng/ml LPS 组培养上清液中有 TNF 活性检出, 但幅度明显下降 ($P < 0.01$)。上述结果提示 LPS 在体外诱导肝

Kupffer 细胞释放 TNF 在一定范围内具有剂量依赖关系, 且呈一定的时间反应性。

参 考 文 献

- [1] Zuckerman SH, et al., 1989 *Eur J Immunol.*, 19: 301
- [2] Sayers TJ, et al., 1987 *J Immunol.*, 137: 2935.
- [3] Doolittle RL, et al., 1981 *Lab Invest.*, 45: 558.
- [4] Mazuski JE, et al., 1988 *Arch Surg.*, 123: 340.
- [5] Flick DA, et al., 1984 *J Immunol Methods.*, 68: 167.
- [6] Beutler B, et al., 1986 *Science*, 232: 977.
- [7] 汪江淮、王正国, 1992 第三军医大学学报, 14: 101.
- [8] Offner F, et al., 1990 *J Lab Clin Med.*, 116: 100.

绵羊体外受精卵的体外发育及冷冻保存研究

刘东军 张锁链 庞也非 薛晓先 廖洪武 海青兰 斯 琴 旭日干

(内蒙古大学实验动物研究中心 呼和浩特, 010021)

近年来, 随着家畜体外受精技术的不断发展, 已开始逐步应用于生产, 而体外受精卵的体外发育及其冷冻保存是该技术应用于生产的关键环节, 因而引起了众多研究者的关注。自从绵羊体外受精技术成功以来^[1,2], 国外一些学者对绵羊体外受精卵体外发育条件进行了探讨^[3,4], 旭日干等^[5]在研究中得到了较高的发育率, 可直接在体外条件下培养至孵化囊胚阶段。但到目前为止, 有关绵羊体外受精卵冷冻保存研究尚未见报道。本文主要探索了绵羊体外受精卵在不同培养条件下的发育能力, 并对发育至桑椹胚~囊胚期的体外受精胚进行了冷冻保存。

材 料 和 方 法

一、卵母细胞的采集和成熟培养

将采自屠宰场的绵羊卵巢置于 37℃ 无菌生理盐水中, 12 小时内带回实验室。用装有 18 号针头的注射器从卵巢表面 2—5 mm 的卵泡内吸取卵母细胞, 吸卵液为含有 3 mg/ml BSA 的 PBS 液, 并加入少量肝素。将回收的卵母细胞置于含有 20 μg/ml HCG (日本持田制药株式会社)、0.1 μg/ml 17β-雌二醇 (E_2 , Sigma)、10% FCS (fetal calf serum, 胎牛血清) 或 NSS (normal steer serum, 阉牛血清, 本中心自制), 并以 10 mM Hepes (Sigma) 缓冲的 M 199 (Gibco) 培养液中, 在 39℃, 5% CO₂ 培养箱内培养 24 小时。

二、精子的获能及授精处理

实验所用新鲜精液采自本中心饲养的种公羊。将

鲜精用含有 10 mM 咖啡因的 BO 液稀释后离心洗涤 2 次(200 g, 5 分钟),然后将浓度调至 $20 \times 10^6 - 30 \times 10^6$ /ml, 在 CO_2 培养箱内培养 1.5 小时,并用 0.2 μM Ionophore A 23187 处理 1 分钟后用于授精。

授精前将成熟培养后卵丘细胞扩展的卵母细胞移入含有 1 mM 咖啡因、20 mg/ml BSA 的 BO 液微小滴中,再加入经获能处理后的精子 50 μl 进行授精处理。

三、受精卵的体外发育培养

授精后 6—8 小时将卵子移入发育用培养液继续培养。发育用培养液为含有 10%FCS 或 NSS 和 120 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 丙酮酸钠,并以 10 mM HEPES 缓冲的 M 199 培养液。分别于授精处理后 72 小时和 7—10 天统计卵裂率和桑椹胚—囊胚的发育率。

四、体外受精胚的冷冻保存及解冻

选择发育正常的桑椹胚和囊胚,在 PBS+20% FCS 中洗涤两次,然后移入 PBS+20%FCS+10% 乙二醇的冷冻保护液中平衡 20 分钟,装管后置于胚胎冷冻机中(日产,HOXAN)进行冷冻。冷冻程序为:从室温直接置于 -7°C 的胚胎冷冻机中,5 分钟后进行人工植冰,平衡 10 分钟后以 0.3 $^\circ\text{C}/\text{分}$ 的速度降温至 -30°C ,然后投入液氮。

解冻时将盛有胚胎的冷冻管直接从液氮中取出投入 37 $^\circ\text{C}$ 水浴中,轻轻摇动至冰晶融化,然后分别移入 PBS+20%FCS+6% 乙二醇、PBS+20%FCS+3% 乙二醇、PBS+20%FCS 的解冻液中,每步平衡 10 分钟。统计胚胎形态正常率,形态正常的胚胎可供移植。

结 果

一、体外受精卵的体外发育

在授精后 72 小时和 7—10 天分别统计卵裂率和桑椹胚—囊胚发育率。结果 M 199 + NSS 组的卵裂率(45.2%)显著高于 M 199 + FCS 组(36.9%) ($P < 0.05$), M 199 + NSS 组桑椹胚—囊胚发育率为 23.4%, M 199 + FCS 组为 11.6%,两组间差异极显著($P < 0.01$)。实验结果表明,在 M 199 培养液内添加 NSS 的培养效果显著优于添加 FCS 的效果。实验结果见表 1。

二、体外受精胚的冷冻保存

冷冻保存后的桑椹胚和囊胚,经解冻后形

表 1 培养液内添加不同血清对体外受精卵发育的影响

培养液组成	培养卵数	卵裂卵数 (%)	桑椹胚—囊胚数 (%)
M 199 + FCS	225	83(36.9)a	26(11.6)c
M 199 + NSS	547	247(45.2)b	128(23.4)d

a < b $P < 0.05$

c < d $P < 0.01$

态正常率分别为 82.0% 和 71.9%,两者间无显著差异,表明桑椹胚和囊胚期的冷冻保存效果无明显不同。实验结果见表 2。

表 2 体外受精胚不同发育阶段的冷冻效果

发育阶段	冷冻—解冻 胚数	形态正常胚 数(%)	形态异常胚 数(%)
囊 胚	32	23(71.9)	9(28.1)
桑椹胚	50	41(82.0)	9(18.0)

讨 论

绵羊体外受精卵的培养最早是采用中间受体培养法。Crozet 等^[3]将体外受精卵发育至 2—8 细胞的胚胎移植到兔输卵管内,3 天后回收到桑椹胚。Fukui 等^[6]以同种动物为中间受体进行体内培养,使体外受精卵发育至囊胚。在体外培养法的研究中,Fukui 等^[4]采用与输卵管共培养法,突破了 2—8 细胞期阻滞,使体外受精卵可培养至早期囊胚阶段。但采用这种方法得到的早期囊胚不能进一步发育,表明这种培养系统并不完善。由此可见,在绵羊体外受精卵体外发育过程中,输卵管分泌的生长因子对胚胎的发育有一定的作用,但仍需其他因素的共同参与才能维持胚胎的正常发育。从本研究的结果来看,在不添加输卵管上皮的情况下,也可使体外受精卵得以正常发育。在培养液中添加血清 FCS 或 NSS,分别有 11.6% 或 23.4% 的培养卵可发育至桑椹胚—囊胚阶段,这一结果明显优于采用体外输卵管细胞培养法的结果。采用 NSS 对绵羊体外受精卵进

行培养,其卵裂率和桑椹胚~囊胚发育率均显著高于采用FCS的培养效果,因此NSS所含物质可能更适合于绵羊体外受精卵的体外发育。由于本研究所采用的这两种血清均未经纯化处理,因此实验结果的差异也不能排除是因牛个体差异所造成的。在本研究培养过程中,卵丘细胞在培养皿底部形成了一层生长旺盛的贴壁细胞层,可以肯定,该卵丘细胞层分泌的生长因子,对突破绵羊体外受精卵2—8细胞期发育阻滞,维持胚胎正常发育有着重要的作用。究竟何种卵丘细胞分泌物起作用,以及其如何作用于体外受精卵,尚待今后进一步研究探讨。

自从Willadsen在绵羊胚胎冷冻保存的研究中获得成功以来^[1],随着对这项研究的不断深入,绵羊胚胎冷冻保存的方法不断得以改进和完善,但有关绵羊体外受精胚冷冻保存的研究尚未见报道。在绵羊胚胎冷冻保存的早期研究中,大多采用DMSO和甘油为冷冻保护剂。1984年Tervit和Goold在研究中发现,以乙二醇为冷冻保护剂的冷冻效果明显优于甘油^[8]。本研究以乙二醇为冷冻保护剂,首次对绵羊体外受精胚进行了冷冻保存,经解冻后,桑椹胚和囊胚的形态正常率分别达82.0%和71.9%。实验结果表明,体外发育至桑椹胚和囊胚期的体外受精胚,它们的冷冻保存效果无明显差异,不会受体外培养时间长短的影响而改变其生存能力。这一实验结果与采用体内受精胚进行冷冻保存的效果大体相同^[9],表明通过体外受精、体外发育得到的胚胎,其对冷冻保存的耐受程度与体内受精胚无明显差异。这也证明了本研究体外培养系统较为完善,为体外受精卵的发育提供了较理想的条件。与此同时,本研究首次为绵羊体外受精胚的冷冻保存提供了实验依据和方法。关于冷冻保存胚胎移

植的实验将另文发表。

摘 要

将体外成熟、体外受精的绵羊卵子,在体外培养至桑椹胚~囊胚期并进行冷冻保存,观察了培养卵的体外发育和冷冻保存效果。从来自屠宰场的绵羊卵巢中抽取卵母细胞,用含有10%FCS(或NSS)、HCG、E₂和Hepes的M199培养24—26小时,再以经Ionophore A23187诱导获能的新鲜精子进行授精。授精后6—8小时移入发育用培养基内进行培养,发育用培养基为含有10%FCS(或NSS)、丙酮酸钠、Hepes的M199。授精72小时后,FCS组和NSS组的卵裂率分别为36.9%和45.2%,后者显著高于前者。继续培养7—10天后,桑椹胚~囊胚的发育率分别为11.6%和23.4%,两者间差异极显著。将桑椹胚和囊胚冷冻保存于PBS+20%FCS+10%乙二醇冷冻液内,解冻后的胚胎形态正常率分别为82.0%和71.9%。

参 考 文 献

- [1] 花田章, 1985, 家畜繁殖学杂志(日), 31(5): 21-26.
- [2] Cheng et al., 1986, *Theriogenology*, 25(1): 146.
- [3] Crozet, N. et al., 1987, *Gamete Res.*, 16: 159-170.
- [4] Fukui, Y. et al., 1988, *Theriogenology*, 29(4): 883-891.
- [5] 旭日干等, 1989, 内蒙古大学学报(自然科学版), 20(4): 564-569.
- [6] 福井丰等, 1987, 家畜繁殖学杂志(日), 33(4): 附6.
- [7] Willadsen, S. N. et al., 1974, *Cryobiology*, 11: 560.
- [8] Tervit & Goold, 1984, *Theriogenology*, 21: 268.
- [9] Cocero, M. J. et al, 1988, *Theriogenology*, 29: 238.

书讯 韩貽仁编著的《分子细胞生物学》(高等教育出版社, 1988)是供综合性大学和师范院校本科生使用的细胞生物学教材,对细胞这一生命的最基本的结构和功能单位作了全面系统的介绍,反映了80年代中期细胞生物学发展水平,并注重系统性、先进性和思想性,有利于学生扩大知识面,广开思路。本书已被高校广泛采用,受到好评,1992年获国家教委优秀教材一等奖,中科院有关研究所也将该书列为硕士生入学考试主要参考书。该书由新华书店于每年12月1日至15日向各校教材管理部门征订,请需购此书的读者注意预订期,按时向省级新华书店预订。