

单位代码 10635

学 号 2004428

西南大學

硕士学位论文

小鼠胚胎体外培养研究

论文作者： 季高峰

指导教师： 李跃民 教授

学科专业： 临床兽医

研究方向： 小动物外科

提交论文日期： 2006 年 5 月 日

论文答辩日期： 2006 年 6 月 日

学位授予单位： 西南大学

中国·重庆

2006 年 5 月

Master Thesis of
Southwest University

Research of Mouse Early Embryos Culture
in Vitro

Specialty: Clinic Veterinarian

Direction: small animal surgery

Advisor: Professor Li Yuemin

Master Candidate: Ji Gaofeng

Chongqing China

May 2006

独创性声明

学位论文题目：小鼠胚胎体外培养研究

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得西南大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者：李高峰 签字日期：2006年 6月 1日

学位论文授权使用授权书

本学位论文作者完全了解西南大学有关保留、使用学位论文的规定，有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权西南大学研究生院可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

(保密的学位论文在解密后适用本授权书，本论文：不保密，保密期限至 年 月止)。

学位论文作者签名：李高峰

签字日期：2006年 6月 1日

学位论文作者毕业后去向：

工作单位：_____

通讯地址：_____

导师签名：李洪斌

签字日期：_____年 月 日

电话：() _____

邮编：_____

小鼠胚胎体外培养研究

临床兽医专业硕士研究生： 季高峰

指导教师： 李跃民 教授

摘要

哺乳动物早期胚胎的体外培养是胚胎工程技术中一个重要的环节。无论是在阐明早期胚胎的发育机理、制作转基因动物等研究领域，还是在生产领域为胚胎移植提供大量可移植胚胎等方面都发挥着举足轻重的作用。国内外学者在该领域已经进行了大量卓有成效的研究。但是到目前为止体外培养的哺乳动物早期胚胎，高质量的囊胚发育率还不高，都还远远不能满足人们生产和研究的需求。近年来，大多数的研究者都将注意力放到了培养液配方改良的研究上，而忽略了胚胎的培养方法对胚胎体外培养的贡献。事实上胚胎在体内的发育环境是动态的，并有输卵管上皮细胞的支持。本研究旨在设计创新一种动态的物理培养系统，观察与检测胚胎体外发育情况，以便支持并改善早期胚胎的体外发育效果。本试验自制了流动培养装置实现了对胚胎的动态培养，以昆明小白鼠为实验材料，研究比较了流动培养、开放式培养和常规微滴培养三种方法对小鼠 2-细胞胚胎体外发育率的影响。同时比较了三种培养方法中加入输卵管上皮细胞后的培养效果。试验结果如下：

试验一 适宜流速的筛选。

本试验选取了 0.05ml/h、0.1 ml/h、0.2ml/h 三个当量的流速作为试验流速，并分别以这三种流速对小鼠的 2 细胞胚胎进行了体外培养；以囊胚出现比率为检测指标，对培养效果进行了观察和比较，结果发现：0.05ml/h 时效果较好，培养 72 小时后能获得较高的囊胚率（73.3%，22/30）；0.1ml/h 和 0.2ml/h 组分别获得（51.6%，15.5/30；35%，10.5/30），三组结果差异极显著 $P < 0.01$ 。后期试验采用的流速为 0.05ml/h。

试验二 流动培养、微滴培养和开放式培养三种培养方法培养结果比较。

本试验以囊胚出现比率为检测指标，对开放式培养、微滴培养和流动培养三种培养方法，体外培养小鼠 2 细胞胚胎的结果进行了比较。结果发现：开放式培养在 72 小时后能获得较高的囊胚率：75%(22.5/30)。流动培养方法较微滴培养方法的囊胚率略高 73.3%(22/30)：71.7%(21.5/30)；三种培养方法的培养结果差异不显著 $P > 0.05$ 。培养 72 小时后胚胎的退化率为：流动培养组最低(16.7%,5/30),微滴组和开放组的退化率均为 21.7% (6.5/30)。

试验三 输卵管上皮细胞对三种培养方法的贡献值比较。

本试验通过在三种培养系统中添加水牛输卵管上皮细胞，来实现对小鼠胚胎共培养的目的

的。然后统计了三种共培养系统中胚胎囊胚率的提高比例，结果发现：输卵管上皮细胞在开放式培养方法中对囊胚率的贡献值为： $76.75\%-75\%=1.7\%$ ；在流动培养方法中对囊胚率的贡献值为： $80\%-73.3\%=6.7\%$ ，而在微滴培养方法中的提高效果不明显（ $71.7\%-71.7\%=0$ ）。

结论 本实验条件下，以流速为 0.05ml/h 时的流动培养能较好的支持小鼠的 2 细胞胚胎发育到囊胚阶段并孵化；动态的流动培养同静态的微滴培养和开放式培养对小鼠的 2 细胞胚胎的体外培养结果相近；输卵管上皮细胞在流动培养装置中对囊胚率的贡献值，较微滴培养和开放式培养高。综合结果表明本实验室改进制作的早期胚胎流动培养体系能够替代目前通用的静态培养体系。

关键词：昆明小白鼠 胚胎体外培养 流动培养 输卵管上皮细胞 共培养

Research of Mouse Early Embryos Culture in Vitro

Clinic Veterinarian master: Ji Gaogeng

Tumor: Professor Li Yuemin

Abstract

The technique of early embryos culture in vitro is an important tache to the mammal embryos engineering technology. No matter in research field, or in production field, it plays an important role. Many scholars have made lots of excellent researches to perfect this technique. But up to today, the technique is far from perfection because of the low blastocyst production rate and the poor quality of the blastocyst. Most of the researchers paid more attention to the improvements of the culture media. They think that the method is perfect, which is used to culture the embryos. But, actually, the environment is dynamic and supplied by the oviduct epithelia, in which the early embryos developed. On the purpose of indicating whether this dynamic physical environment can induce the development of the embryos. We made a fluid culture device for model the dynamic environment of embryos culture in vivo. And we used fluid culture device, open culture method and normal micro-drop culture method to culture 2-cell mouse embryos. Then we made the compare of the culture result.

Experiment 1: To choose the fit flow rate:

This experiment was made to choose a suitable flow rate for the flow culture system. Three groups of different flow rate were used to culture 2-cell mouse embryos, 0.05ml/h; 0.1ml/h and 0.2ml/h. Then we compared the blastocyst rate of each group after 72h culture in vitro. The result shows that the group at 0.05ml/h flow rate had make more blastocyst(73.3%, 22/30). The blastocyst rate of the group of 0.1ml/h and the group of 0.2ml/h are (51.6%,15.5/30) and (35%,10.5/30). The differences of the blastocyst rate of the three group are bally markedness($p < 0.01$)

Experiment 2: The compare of the culture results by the three culture systems

This experiment was made to show that whether the flow culture system can supply the 2-cell mouse embryos for developing to blastocyst; and whether the flow culture system can enhance the blastocyst production rate.

The mouse 2-cell embryos were separated into three groups. One cultured in open culture system, one in normal micro-drop system and one in flow culture system. The blastocyst rates and the degeneration rate were compared after 72h culture in vitro. The result is that the open culture system can get higher blastocyst rate after 72h culture in vitro(75%,22.5/30),the second is flow culture system(73.3,22/30), the micro-drop culture system get 71.7%(21.5/30) blastocyst rate. The degeneration rate of the flow culture system is the lowest(16.7%, 5/30);

Experiment 3: The compare of the contribution of the oviduct epithelial cell to the blastocyst rate of the three culture systems,

For detecting the contribution of the oviduct epithelial cell to the blastocyst rate in vitro culture system, we designed experiment 3. We add the buffalo oviduct epithelial cell in the three culture system: open culture system, micro-drop culture system and flow culture system. And then we compared the blastocyst rate of each culture system after 72h. The results show that when added the oviduct epithelial cell, the blastocyst rate in three culture systems are all increased, but in flow culture system the enhancement is greater than the open culture system and micro-drop culture system (6.7/1.7/0).

Results :0.05ml/h is a fit flow rate for flow culture system; Flow culture system can sustain the 2-cell mouse embryos develop to blastula; Adding oviduct epithelial cell can enhance the blastocyst rate of mouse embryos when culture in vitro; The enhancement is greater in flow culture system than micro-drop culture system and open culture system.

Key words: mouse embryos culture in vitro flow culture system
oviduct epithelial cell co-culture

目录

摘要	I
Abstract	III
第一章 文献综述	1
1.1 哺乳动物早期胚胎体内发育的生理机制	1
1.1.1 早期胚胎发育的分子控制机制	1
1.1.2 体内早期胚胎发育的输卵管环境	2
1.2 影响哺乳动物胚胎体外发育的因素	3
1.2.1 胚胎自身对早期胚胎体外发育的影响	3
1.2.2 培养液成分对早期胚胎体外发育的影响	4
1.2.3 体细胞共培养对早期胚胎体外发育的影响	5
1.2.4 体外培养方法对胚胎体外发育的影响	7
1.3 小结	9
第二章 流动培养装置制作	11
2.1 装置设计原理	11
2.2 参数选择	11
2.2.1 试验流量选择:	11
2.2.2 装置参数确定	12
2.3 材料与仪器	12
2.4 方法	12
2.4.1 2%琼脂制备:	12
2.4.2 装置制作过程:	13
2.5 装置示意图:	13
第三章 小鼠胚胎的体外培养	15
引言	15
3.1 材料与方法	15
3.1.1 材料	15
3.1.2 方法	17

3.2 试验设计	18
3.2.1: 试验 1	18
3.2.2: 试验 2	18
3.2.3: 试验 3	18
3.3 实验结果	19
3.3.1 试验 1 结果	19
3.3.2 试验 2 结果:	19
3.3.3 试验 3 结果:	22
3.4 讨论	23
3.4.1 在流动式培养体系中培养液流动的速度对早期胚胎发育的影响	23
3.4.2 三种培养方法对早期胚胎发育效果的比较	23
3.4.3 输卵管上皮细胞对三种培养方法的影响	24
3.5 结论	25
参考文献	26
附录	32
致谢	35
发表论文	36

第一章 文献综述

哺乳动物早期胚胎体外培养技术,是哺乳动物胚胎工程的关键技术之一,无论是在阐明早期胚胎发育机理、制作嵌合体动物、转基因动物的研究领域,还是为胚胎移植提供大量可移植胚胎的生产领域,都发挥着举足轻重的作用。

1.1 哺乳动物早期胚胎体内发育的生理机制

自从两性配子结合形成合子的单细胞胚胎后,个体发育就开始启动,经过卵裂、桑椹胚、囊胚等阶段最后发育成完整的个体。这里的早期胚胎是指哺乳动物由受精卵开始到胚胎伸长且没有与子宫建立组织联系的游离阶段的胚胎^[1]。

1.1.1 早期胚胎发育的分子控制机制

1.1.1.1 母源控制时期

哺乳动物早期胚胎的发育是由卵母细胞中的一些因子来控制的。这些因子是在卵子成熟过程中合成和储存的,在胚胎基因激活前,胚胎的发育是由这些因子来调节的。

卵母细胞的RNA合成在原始卵泡就非常活跃,一直到生发泡破裂结束后停止。其合成的RNA主要是一些mRNA的前体、rRNA和一些小分子RNA^[2]。在胚胎发育早期的配子配合、细胞代谢、细胞连接的形成等方面都起着重要作用。如:有的mRNA表达的物质是Na/K ATP酶和细胞连接蛋白,参与胚胎后期发育、囊胚形成。

1.1.1.2 胚胎基因控制期

精子卵子受精后,胚胎发育将经历有母源调控向自身调控的转化过程,称为MET (transition from maternal to embryonic control of development)。动物种类的不同,胚胎基因组转录启动时间(即MET启动时间)不同:小鼠在2细胞期^[3],牛在8细胞期^[4],猪在4细胞期^[5],绵羊在8细胞期^[6],人在4细胞期^[7]。

胚胎细胞核中组蛋白的乙酰化或DNA的复制是启动其基因组转录的首要条件。组蛋白乙酰化以后,DNA在核小体中的包装形式发生改变,来自卵母细胞的转录调控因子可结合到基因组的转录体调控区,激活基因组的转录活性。DNA在复制时,其双链打开,为转录因子的结合创造条件。对小鼠和牛胚胎基因转录活性的研究显示,在MET之前,DNA一直与来自卵母细胞的组蛋白结合,而来自胚胎细胞合成的组蛋白一般在MET后与DNA结合,且结合速度与DNA转录和复制活性直接相关,这说明胚胎细胞合成的组蛋白直接参与胚胎基因组转录活性的调节。此外,在哺乳动物的卵母细胞中还发现了一些其他转录启动因子,参与调节胚胎基因组的活化^[8]。

在哺乳动物胚胎的早期发育中,只有顺利完成MET的胚胎才能继续发育,否则胚胎的发育

会停止,称为发育阻滞(Development Block)。

在受精后,母源因子逐渐下降,胚胎基因组的转录和表达开始,胚胎的发育逐渐由自身合成物质调控。哺乳动物的体内、外生产的早期胚胎在体外培养时,非常容易出现发育阻滞,阻滞时期多发生在胚胎的MET阶段。Bowman^[9]于1970年最早发现体外培养的哺乳动物胚胎普遍存在的发育阻滞现象。随着胚胎体外培养技术的广泛应用,胚胎发育阻滞的克服也成为胚胎发育学研究的热点领域。

1.1.2 体内早期胚胎发育的输卵管环境

哺乳动物的卵子与精子在输卵管的壶腹部形成合子后,个体发育开始,精子和卵子在输卵管壶腹部完成受精后,胚胎就开始向子宫角方向移行,胚胎在移行的过程中卵裂。动物的种类不同,胚胎移行到子宫的时间和发育阶段不同。小鼠受精卵在输卵管中移行72小时,发育到桑椹胚期时进入子宫^[10];牛的受精卵在输卵管中移行72~84小时后,在8~16细胞阶段进入子宫;猪受精卵在输卵管移行46~48小时,4~6细胞阶段进入子宫^[11]。胚胎在进入子宫角之前的发育主要依赖于卵子中储存的物质和输卵管环境的调控。桑椹胚之前是发育阻滞和胚胎衰老发生的敏感期,所以输卵管特殊的生理环境对早期胚胎的正常发育至关重要。由于输卵管环境在雌性动物发情周期中呈现周期性变化,因此,研究输卵管的生理特点是非常困难的,但在排卵后输卵管表现出一些共同的生理特点:

1.1.2.1 物理环境

雌性动物排卵后,输卵管纤毛上皮细胞的摆动和输卵管肌层的收缩运动明显增强,腺上皮的分泌功能明显增强,输卵管的液流量增大,胚胎在这三种力量的作用下,滚动移向子宫角。因此,胚胎生活在动态变化体系,而不是静态环境中。

Fisher 和 Bavister^[12](1993)用敏感电极测定了仓鼠、家兔和猕猴的输卵管和子宫中氧气的浓度,发现其中的氧气浓度仅为空气中的40%。而仓鼠和家兔在胚胎移植期的氧气浓度更低。低氧环境对控制胚胎生存环境中过氧化物的浓度以及促进胚胎发育是十分有利的。

1.1.2.2 化学环境

(1) 营养物质

输卵管和子宫液中有些氨基酸的浓度明显高于血液中的浓度,如甘氨酸、牛磺酸和丙酮酸。输卵管上皮在排卵后能分泌多种蛋白质因子:如白蛋白等^[13],研究发现这些蛋白因子通过与胚胎表面的受体结合或直接被胚胎胞饮等方式来调控胚胎的早期发育。

(2) 能量物质

输卵管和子宫腔中支持胚胎发育的能量物质主要有丙酮酸、乳酸和葡萄糖。它们的浓度是在不断的变化的,如在小鼠输卵管中,卵丘细胞存在时丙酮酸的浓度为0.37mmol/L,而对

照仅为0.14%mmol/L (Gardiner & Leese, 1990)^[14], 家兔输卵管上皮在排卵后3天, 葡萄糖的流量比排卵时下降50% (Edwards & Leese, 1993)^[15]; 猪输卵管壶腹部和壶-狭连接部葡萄糖的浓度由排卵前的0.97%mmol/L和1.65%mmol/L, 分别降到0.25%mmol/L和0.17%mmol/L (Nichol et al., 1992)^[16]。这说明哺乳动物胚胎早期利用的主要能量是丙酮酸和乳酸, 而葡萄糖的利用率下降。胚胎体外培养研究的结果已证明葡萄糖对卵裂阶段胚胎的发育有抑制作用, 但胚胎进入囊胚期时对葡萄糖的利用明显增加。

(3) 电解质

在胚胎发育期, 输卵管液中 K^+ 和 HCO_3^- 的浓度较高, K^+ 的浓度是血液中的3倍, 而 HCO_3^- 的浓度由排卵前的35mmol/L升至排卵后的90mmol/L (Leese, 1995)^[17]。输卵管内的PH变化主要依赖于 HCO_3^- 浓度的变化, 因为受精时要求的壶腹部的PH值维持在7.6~7.8, 而胚胎发育时的理想PH值是7.1~7.3, 因而 HCO_3^- 在输卵管液中的地位相当重要。胚胎的体外培养研究发现提高 K^+ 浓度, 降低 Na^+ 的浓度对其卵裂阶段胚胎的发育有利。

1.2 影响哺乳动物胚胎体外发育的因素

所谓胚胎的体外培养就是指在将受精卵培养在人工合成的培养液中, 使其发育到胚胎的后期阶段的一种实验技术。1949年, Hammond用生理盐水加卵黄将8-细胞的小鼠胚胎培养至囊胚阶段, 随后, 兔、绵羊、牛的早期胚胎体外培养体系相继建立。近年来, 随着卵母细胞体外成熟(IVM)、体外受精(IVF)以及细胞核移植技术的发展, 胚胎体外培养(IVC)的方法也不断完善, 使胚胎体外生产(IVP)成为可能。早期胚胎体外培养技术的建立不仅是胚胎工程发展最基本的条件之一, 且有助于研究早期胚胎的发生、合子基因精密表达调控等。但目前的共同问题是早期胚胎在体外培养过程中对环境变化相当敏感, 发育到桑椹胚和囊胚的比率较低。影响哺乳动物早期胚胎在体外发育力的因素有很多。归纳起来可以将其分为3类:

1.2.1 胚胎自身对早期胚胎体外发育的影响

不同物种的胚胎, 在体外培养时的效果差别很大。由于其不同的基因型决定了物种间代谢类型和代谢途径既有共性又有差异。利用不同方法获得的胚胎在体外的发育同样存在较大差异。体外培养胚胎的获得可以通过两种途径: 一种是从体内获得的胚胎, 例如: 小鼠的冲胚; 另一种是通过体外生产获得的胚胎, 如: 体外受精(IVF)、单精子注射(ICSI)以及孤雌激活的胚胎。由于用于生产体外胚胎的卵母细胞的成熟不充分, 或在对卵母细胞或胚胎进行处理的过程中对胚胎或卵母细胞所造成各种物理、化学性损伤, 都会使胚胎在体外的发育能力显著的降低。

体内胚胎和体外胚胎在超微结构上有很大的不同。如体外胚胎的致密化桑椹胚脂滴含量增加, 而成熟的线粒体数目在减少, 含有血清的培养液得到的胚胎更是如此, 液泡化加重和核质比增加, 而且胚胎体外发育速度比体内胚胎发育慢, 牛胚胎比体内发育慢一个周期, 并

且引起细胞数比例下降^[18]。和体内胚胎比较,体外生产的胚胎染色体倍型的异常率高出许多。rRNA基因的活性明显不同^[19],许多蛋白因子基因的表达情况存在差异^[20],冷冻保存的效果也较差^[21]。体外培养系统的缺陷也是导致胚胎吸收、死亡、流产、死胎或出生后死亡、以及胎儿过大综合症(overgrowth syndromes)的一个重要方面^{[22][23]}。

1.2.2 培养液成分对早期胚胎体外发育的影响

胚胎培养液基本上分为三类。I类是:化学成分简单、明确的培养液,是凭经验配制,例如Earle's平衡盐溶液(EBSS);II类则是根据输卵管液的组成而配制。例如输卵管合成液(SOF),这两类培养液一般为简单的碳酸氢盐缓冲盐溶液,补充了能量物质(例如丙酮酸盐,乳酸盐和葡萄糖)、抗菌素以及一个高分子量组分(例如血清、白蛋白或聚乙烯醇)配成;III类是“复合”培养液,含有多种原为体细胞培养而设的成分,例如:组织培养液TCM 199、小鼠培养液M2等等。早期胚胎培养液的配方,人们都倾向于选择在复合培养液中添加各类物质提高胚胎发育力或改善培养效果。目前,这方面的研究已经积累了丰富的经验。

1.2.2.1 能量物质的添加对胚胎体外培养的影响

在不同物种的生殖道内,能量物质的浓度也有差异。如猪输卵管液中能量物质的浓度为:丙酮酸0.21mM、乳酸5.17 Mm、葡萄糖0.59 mM;小鼠的分别是0.14 mM、4.26 mM、5.19 mM;兔子为0.30 mM、3.67 mM、1.46 mM;人的为0.32 mM、10.50 mM、0.50 mM^[24]。所以在配制培养液时应该对不同动物胚胎提供不同的能量组合。

早期胚胎发育能量来源可能有两种机制:通过利用G(葡萄糖)的酵解途径和丙酮酸或草酰乙酸为底物的氧化磷酸化途径。研究发现,在胚胎致密化前后,使用氧化磷酸化抑制剂的效果明显的不同。小鼠,牛和猪胚胎使用这种抑制剂的胚胎在致密化后能继续发育,在致密化之前发育严重抑制^[25]。然而抑制糖酵解化合物如乙烯二胺四乙酸或激活三羧酸循环的化合物如二氧乙酸在致密化前使用能改善胚胎的发育^[26]。诸多报道表明,胚胎液中的葡萄糖和磷对早期胚胎发育是有抑制作用的。如仓鼠的胚胎发育阻滞,葡萄糖和磷还能降低呼吸和破坏线粒体结构^[27]。也由试验表明,当培养液中没有磷时,葡萄糖并不对早期胚胎造成抑制^[28]。

C. F. Rosenkrans等(1993)^[29]报道当牛胚胎培养液中有L-乳酸时,添加丙酮酸没有必要。当只有丙酮酸作为能量物质时,当浓度大于1 mM时,囊胚率下降。牛胚胎对乳酸的浓度增加的承受能力比对丙酮酸强一些。丙酮酸和乳酸的比率对维持细胞内NAD⁺/NADH,以及胚胎的抗氧化起平衡作用,LDH的活性在合子时期最高^[24]。J. E. Swain^[30]等报道,不论是体内猪胚胎还是IVF胚胎,都是通过糖酵解来利用大部分的葡萄糖的。IVF胚胎培养到8细胞时糖酵解明显增加。体内胚胎在囊胚期才增加,但糖酵解活动强。丙酮酸可转化为丙氨酸,从而降低胚胎代谢产生的氨的毒性^[31]。丙酮酸也是抗氧化剂,能减少胚胎对氧化应激的敏感程度^[32]。

糖酵解活动在胚胎发育早期是不利的,但是通过降低或完全除去葡萄糖,或添加EDTA(100

微摩/升)可降低糖酵解活动。添加EDTA可能是螯合 Mg^{2+} ,而对糖酵解起调节作用[33]。

1.2.2.2 添加血清对胚胎的影响

血清及牛血清白蛋白是目前牛体外受精(IVF)胚胎体外培养系统中添加的重要成分。血清中含有许多物质:如蛋白质、氨基酸、碳水化合物、微量元素、激素、生长因子、细胞粘着和扩展因子及许多未知因子[34]。当培养液中还有血清时,胚胎颜色变暗,有颗粒,而且增加了糖酵解率^[35]。血清对小鼠的1细胞卵裂有抑制作用[36]。在比较体内来源及体外添加血清及无血清条件下所得到的牛桑椹期胚胎时, Farin C. E等[37]人发现体外桑椹期胚胎中成熟线粒体数量少于体内来源的桑椹胚,而添加血清组中线粒体总量及不成熟线粒体的数目又少于无血清系统。卢克焕等(1994)报道[38],在体外成熟阶段,有、无血清,对牛卵母细胞的核成熟及随后的分裂率无显著影响,但对随后的早期胚胎有显著影响,特别是对早期胚胎的体外发育更为重要。刘东军、杨东山等^[39](2003)试验结果表明:与已报道的体内受精胚胎研究结果相比,体外受精胚胎核仁的发育比较迟缓,培养系统中血清及BSA的添加与否不会显著影响核仁的发育过程。在SOF+FCS和SOF+BSA培养系统中线粒体的发育明显滞后,表明培养系统中血清和BSA的添加可能是造成这种现象的重要原因。所以学者建议前三天,胚胎培养时不加血清。以生产高质量的胚胎。

1.2.2.3 添加生长因子对胚胎发育的影响

胰岛素和类胰岛素生长因子(IGF—I)能提高胚胎致密化和囊胚形成比例,促进蛋白质合成。IGF—II是小鼠胚胎正常发育所必需的^[40]。IGF-1对不同哺乳动物卵母细胞和胚胎发育都有明显的影响。培养液中添加IGF-1主要是降低细胞凋亡和促进细胞分裂^[41]。在无血清培养基中,IGF-1作用尤为显著^[42]。而H. J. Hernandez等^[43](2002)得出50ng/ml的IGF-1足够使4细胞的牛胚胎发育到囊胚阶段。转化生长因子(TGF—a和TGF—p)和表皮生长因子(EGF)能显著提高牛早期胚胎发育到囊胚的比率^[44],EGF还能促进小鼠囊胚滋养层细胞的蛋白合成^[45]。Larson等^[46](1990)在简单培养基中添加TGF—p和牛成纤维细胞生长因子(bFGF),能使39%的牛早期胚胎通过8—细胞阻断,而对照组胚胎无一例通过阻断。

对培养基配方的每一次改进都能在一定程度上提高胚胎在体外的发育力。但是,到目前为止改变培养液配方对胚胎体外发育力提高所做的贡献比人们预想的要小的多。这势必将成为制约胚胎相关生物科技发展的瓶颈。

1.2.3 体细胞共培养对早期胚胎体外发育的影响

近年来,国内外实验室利用哺乳动物上皮细胞及其他细胞作为辅助细胞建立共培养体系,发现有促进胚胎体外发育及生存质量、提高胚胎种植率的作用,较多的文献数据也表明共培养胚胎移植可提高临床妊娠率^{[47][48][49]}。Rieger等^[50]在研究中比较输卵管细胞联合培养与经输

卵管细胞条件化的培养液对原核牛胚发育的影响,发现联合培养中胚胎发育比在条件化的培养液中发育要快,在4~16细胞期,糖代谢在输卵管细胞联合培养液中不活跃,而在桑葚胚期则加快,这符合胚胎发育的生理情况。Ouhibin^[51]发现,小鼠受精卵在M16培养基中单独培养,有4.5%可发育到囊胚期。而当小鼠受精卵分别与牛输卵管、牛输卵管上皮细胞共培养时,其发育到囊胚期的比率分别为77%、67%。Lanzendorf. S. E.^[52]报道来源于体外成熟和受精的猴胚胎与vero cell 共培养,发育至囊胚期的比率为44.5%明显高于对照组。Menezo YR^[53]发现,IVF过程中质量较差的剩余胚胎,与vero cell共培养,有61%的胚胎发育至囊胚,明显高于对照组3%。Andoh^[54]在研究中也发现IVF过程中含有10~30%碎片的胚胎与人输卵管上皮细胞共培养,发育到囊胚期的比率为57%而胚胎与培养基单独培养时,发育到囊胚期的胚胎不到10%。

共培养技术是将体细胞作为营养细胞与胚胎共同培养。由于共培养的细胞克服了种属及组织差异性,故用于共培养的辅助细胞有很多种。但其中最为常用的还是输卵管上皮细胞^[55]。

输卵管是哺乳动物卵子正常受精以及着床前早期胚胎正常发育的最佳场所,这是长期自然选择,物种进化的结果。输卵管不仅为卵子受精发生及早期胚胎发育提供场所,而且参与控制早期胚胎的正常发育。人们发现,在体内的胚胎很少发生阻滞现象,体外培养的胚胎却极易发生阻滞现象,当在培养过程中加入输卵管上皮细胞时,胚胎的阻滞率下降了^[57]。是不是输卵管上皮细胞上存在着某些调控早期胚胎发育的直接或间接的信号机制呢?对这个问题的看法一直以来都存在着争议。Bavister 等^[56]认为,只要严格控制体外培养的环境质量,选择适当的培养液,早期胚胎就能在体外顺利发育,而来自体细胞的信号并非必须的。相反,众多研究者则认为,通过与输卵管上皮细胞共培养,对于早期胚胎体外的正常发育是其他方式不可替代的,共培养系统中的体细胞除了具有诸如清除培养液中有害成份、稳定环境条件之外,更重要的是它们能释放“胚胎营养因子”。

目前,许多实验证据都表明:胚胎与输卵管上皮细胞共培养能有效的克服胚胎体外培养的发育阻滞,提高体外培养胚胎的发育力。但其作用的原理并不完全清楚。可能的作用机制有如下3种:

(1) 输卵管上皮细胞分泌的一些特殊物质,促进了早期胚胎进一步发育。体细胞大量分泌生长因子和细胞因子的时候,共培养胚胎的发育能力也最高^[58]。Watson^[59]等(1992)用反转录DNA扩增法证明,在牛和绵羊上皮细胞中有IGF—I、IGF—II、TGF—A、TGF— β 和FGF的mRNA转录。由此可见,共培养细胞能分泌大量的生长因子。李逸平^[60]等(1993)利用兔输卵管上皮细胞分泌蛋白的电泳图谱,确定糖蛋白的分子量范围介于44—68kD,其中以68kD区带最为明显。提示体外培养的输卵管上皮细胞分泌糖蛋白。他们用¹²⁵I标记示踪技术分析不同发育时间大鼠早期胚胎透明带中分泌性糖蛋白的情况发现,与兔输卵管上皮细胞共培养的大鼠胚胎,其透明带上都结合有68kD的蛋白质,而对照组中未发现这条特征蛋白区带。说明输卵管上皮细胞分泌的糖蛋白对胚胎发育有作用。

(2) 输卵管上皮细胞可以代谢降解胚胎发育过程中产生的有毒物质,如铵、次黄嘌呤和

氧自由基等。Joo^[61]等(2001)将小鼠的体内 1—细胞胚胎与人输卵管细胞共培养发现,与对照组相比,共培养组的氧自由基浓度明显降低。说明共培养细胞可以消除氧自由基对胚胎的不利作用。铵和次黄嘌呤也是胚胎发育过程中产生的物质。共培养细胞可能通过降解培养液中的铵和次黄嘌呤,削弱二者对胚胎的不利影响。

(3) 共培养细胞可能通过胚胎与细胞接触促进胚胎发育。Joo^[61]等(2001)将小鼠的体内 1—细胞胚胎与人输卵管上皮细胞共培养,在胚胎与细胞之间放一插入物,使胚胎与细胞不接触,发现无一例胚胎发育到囊胚,而共培养中有 45%的胚胎发育到囊胚。这说明,在胚胎与体细胞不接触的共培养体系,体细胞对胚胎的有利作用消失。但目前有关体细胞条件化培养基的研究证明,体细胞与胚胎不接触也能促进胚胎发育。

1.2.4 体外培养方法对胚胎体外发育的影响

目前用于哺乳动物胚胎体外培养的方法有很多,其中最具代表性的有以下几种:

(1) 序贯培养方法

由于胚胎发育的不同时期,对培养液的成分有不同的要求,用单一培养液显然是不足的,近年来发展起来的序贯培养系统可以弥补这种不足。序贯培养是一种新的体外培养方法,它是指按照体外培养胚胎在不同发育时期代谢需求的不同,配制一系列不同成分的培养液,进行序列更换,从而获得更高的囊胚率的培养方法。

目前最流行的是应用两种培养液进行序贯培养来产生晚期可存活的囊胚。这是由澳大利亚的David Gardner^[62]及其同事在基础研究及初步临床应用中发现的。Gardner研究小组不仅阐明了促进胚胎发育的营养成分的改变,而且说明了体外与月经周期特定时期内母体生殖道一子宫腔在代谢物质浓度方面有明显差别。进而,Gardner实验室又证明胚胎发育的理想环境的首要条件是要有氨基酸的存在。早期胚胎发育需要特定的氨基酸,而胚胎基因组激活后则需要全部20种氨基酸。根据上述研究结果,Gardner等制成了序贯培养液,分别称为G1和G2,此后应用此合成培养液进行了囊胚培养,移植后获得了妊娠成功。不久这种培养液就投入了市场。第一次对其成分稍作改变后,商品名称为s1和s2,第二次改进后的版本称G1.2和G2.2。目前众所周知的是GIII系列。大约在同一时期,G氏培养液在科罗拉多生殖医学中心临床应用,来自斯坦福大学的合作者们则应用Ham' S F-10改良后P-1培养液,又称囊胚培养液,进行胚胎体外培养后,成功地临床妊娠并分娩。

但近来序贯培养液有效的培养可存活囊胚的方法受到了部分研究者的挑战,他们认为改良后完善的单一培养基也可做到这些。尽管我们应对将来专门的完美的单一培养液的可能性保持客观态度,但必须强调的是这种培养液的营养成分必须达到序贯培养的相同效果。

(2) 开放式培养

将获得的受精卵放置在含有过量培养液的培养皿中培养,培养过程中一般不进行换液,

直到胚胎发育的最后阶段。其优点是：操作简单；缺点是：不易进行结果观察，消耗的培养液量较大。

(3) 微滴培养法

Brinster^[63]在1963年发明了用液体石蜡覆盖的微滴培养法(简称微滴覆盖法)，在胚胎的培养试验中取得了比较好的效果。由于这种方法较普通培养方法简单、易操作又有较好的培养效果，现在已成为一种通用的胚胎培养方法。但是微滴培养也存在着一些不足之处如：

1) 制作的微滴需要覆盖石蜡油，而石蜡油是脂溶剂，它可能会溶解培养基中的脂类物质，从而对胚胎的生长造成影响；

2) 从微滴培养动力学角度分析^{[64][65]}：微滴培养过程中一次性投入物料就不再补充，直到下次换液，这样静态的分批培养就会使胚胎的增殖环境出现比较大的波动。其大致可分为：滞后期——胚胎细胞适应新环境的阶段。在细胞培养过程中，在培养液更换后的一段时间内，往往看不到细胞明显的生长，营养基质几乎不消耗。其原因是①细胞在新环境中就必须合成有关酶，然后才能利用这些物质；②许多胞内酶需要辅酶，他们是一些小分子物质或离子，具有较大的膜透过性，当细胞被移到一个新环境时，这些物质会扩散流失；③胚胎培养中胚胎生长分泌的一些有益因子也会通过换液产生比较大的波动；当细胞适应新环境后就会出现快速生长的指数生长期^[66]；随之进入减速期：培养基中养分的消耗浓度降低，有害物质的积累使细胞的生长受到抑制；如果更换液体的时间间隔较长，细胞就会进入衰亡期：细胞生存的环境进一步恶化，细胞死亡。

产物抑制方程为：

$$\text{比生长速率} = \frac{\text{限制性基质浓度}}{\text{Ks} + \text{限制性基质浓度}} \cdot \text{最大生长速率} \cdot (1 - K \cdot \text{产物浓度})$$

其中 K 为常数。

由此可见微滴培养时液体更换间隔时间要合适：过慢，就会出现胚胎的凋亡；过快，对胚胎的频繁操作必定影响其生存的物理环境，不利于胚胎生长。这个“度”还没有具体的衡量标准。

(4) 套皿法培养^[68]

2004年赵永贞等建立一种不依赖于液体石蜡的早期胚胎体外培养方法——套皿法，并比较了几种不同处理方法体外培养胚胎的效果。结果显示。采用套皿法进行胚胎培养。盖液体石蜡和不盖液体石蜡皿中的胚胎在各阶段的发育率差异不显著。实验设计的套皿法是一种有效的早期胚胎体外培养方法，为早期胚胎体外培养提供了一种新方法。

(5) 动态培养法

胚胎之所以能在体内很好发育，主要原因在于保证其正常发育的环境是一个既能合理提供营养又能及时清理废物的动态培养系统。然而，人们培养胚胎的一贯做法是使用一种培养液培养到底。这容易导致营养物质供应不平衡；更大危害在于导致过氧化物等毒性物质积累和胚胎自身代谢废物增加，致使胚胎发育发生阻断。一些研究者们就仿效生物体内的物理环境对胚胎尝试了动态培养研究。所谓动态培养就是在原培养基中连续的添加新的培养液，同时抽出等量的旧培养液，使培养基内的营养成分维持相对稳定，模拟胚胎在体内生存的动态环境，从而提高其胚胎的发育力。

流动培养的方法在细胞的培养中很早就得到了应用^[67]：1912年伯罗尝试设计了一种简单的灌注小室培养模型来培养细胞。目前动物细胞培养中占有主流优势的培养工艺——流加式培养的方法就是一种典型的流动培养的模型。同时，也是近年来在对动物细胞大规模培养研究中的热点。

1996年美国的胚胎学者Bebee^[69]等首次将其应用到胚胎的培养中。1997年Lim JM, Reggio BC^[70]等尝试了用流动培养同共培养结合培养牛的早期胚胎：他们利用了伯罗灌注小室培养模型来培养8~16细胞的牛胚胎，设计中的液体从小室1溢出通过一个气室流向胚胎培养的小室2，同时在1中加入输卵管上皮细胞，收到了比较理想的结果。2002年Hickman. DL^[71]等，通过提供静态和动态媒介环境的装置，分别培养移植前的小鼠早期胚胎来比较静态的微滴培养系统与动态培养系统。结果显示：胚胎发育成囊胚(blastocyst)阶段在两个系统的比率并无明显差异，但在静态微装置环境比对照组产生明显较多桑葚体。作者从这些结果观点上考虑是否动态媒介环境能模拟输卵管中的环境而改善胚胎活性，并指出在动态媒介环境中物质传输速率，及脉动式液体流在今后的动态系统研究中应得到重视。2002年Matthew B. Wheeler^[72]用微流管道技术培养猪的胚胎囊胚发育率为1.8%，而微滴培养组只有1.2%；2004年Stephanie Raty, Eric M. Walters等尝试用微通道装置来培养小鼠的胚胎和卵母细胞，他们用不同材料制作成为通道装置将小鼠的胚胎和卵母细胞放入其中培养，并将其与微滴培养法的结果进行比较；发现动态培养组的胚胎体囊胚化时间较静态微滴组缩短；同时，微通道培养组的囊胚退化率较静态微滴组低。

1.3 小结

随着科学技术的不断进步，实验技能的不断完善，终将会给发育生物学带来巨大的变化。胚胎体外培养既是基础研究，也是应用性研究；他的进步也是与其他科学密不可分的，在现代生物工程中，胚胎工程是一个新的亮点，他不仅能加快良种繁殖，更重要的是能为濒危动物保护、生产转基因动物、克隆动物及人类辅助生育等方面做出巨大的贡献。胚胎培养的目的就是获得高质量的、发育能力好的囊胚。目前，体外生产胚胎已有很大的发展，但仍然不能满足实际生产和科研的需要，体外获得胚胎的质量和体内正常胚胎发育能力相比差异很大。

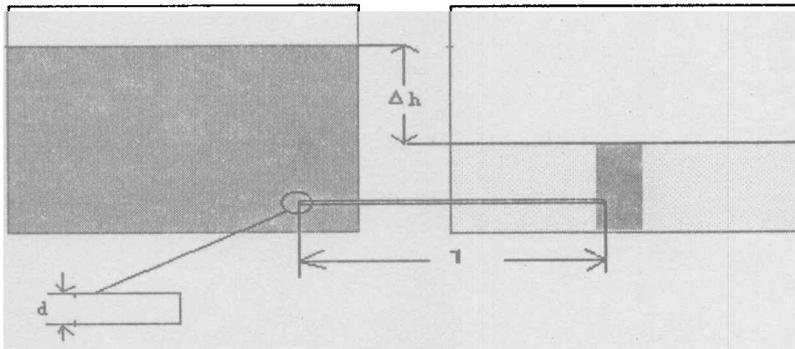
在目前的胚胎研究中，既要尊重客观规律（生殖规律），也要勇于创新，通过改善早期胚胎体外培养的方法有望使囊胚出现比率得到明显提高。

第二章 流动培养装置制作

2.1 装置设计原理

利用液体液面差所提供的势能，使培养液从一个势能较高的储液平皿中，通过限流微管流到培养池，培养池中的培养液利用培养池与废液池中的液面差，将废液通过微管转移到废液皿中。从而实现流动培养的目的。

这种液体流动属于牛顿经典流体力学范畴。液体的流速（单位时间流量）与两个液面的液面差 h ；管道直径 d ；管道长度 l ；液体粘滞系数 μ ；温度等因素有关。如下图所示：



经典牛顿流体力学中微管流量的计算遵循伯努里方程：

$$q = \frac{d^2}{32\mu l} A \Delta p \quad \dots\dots(1)$$

注： d 为微管的直径； μ 为培养液的粘滞系数； l 为微管的长度； ΔP 为两侧液体的势能差； q 为流量； A 位管道截面积。

$\because A = \pi d^2/4 \dots\dots(2)$ $\Delta P = \rho * g * \Delta h \dots\dots(3)$ \therefore 将 (2) (3) 带入 (1) 式可得：

$$d = \sqrt[4]{\frac{128\mu \cdot l \cdot q}{\pi \cdot \rho \cdot \Delta h \cdot g}} \quad \dots\dots\dots(4)$$

2.2 参数选择

2.2.1 试验流量选择：

本试验在设计流量选择时，主要以本试验中开放式培养组为对照（开放式培养 2~3ml 培养液供应 30 枚胚胎体外培养 72 小时）。设计了以下 3 组流量：0.05ml/h、0.1ml/h、0.2ml/h 来进行对比试验。

2.2.2 装置参数确定

$$l=4\text{cm};$$

$$\Delta h \leq 5\text{mm};$$

$$\mu \text{ 近似取 } 4 \times 10^{-3} \text{ pa.s};$$

$$\rho = 1.027 \text{ 千克/立方米};$$

带入(4)式求出不同流速下所需管道的直径:

$$q=0.05\text{ml/h 时}; \quad d \leq 0.05\text{mm};$$

$$q=0.1\text{ml/h 时}; \quad d \leq 0.06\text{mm}$$

$$q=0.2\text{ml/h 时}; \quad d \leq 0.07\text{mm}$$

2.3 材料与仪器

- 1、体视显微镜:OLYMPUS. Japan Olympus Optical CO., LTD;
- 2、倒置显微镜:重光, 重庆光电仪器有限公司;
- 3、净化工作台:XSW-CJ-2A标准型, 吴州市绿叶空调净化有限公司;
- 4、立式自动电热压力蒸汽灭菌器:LDZX-40B型, 上海申安医疗器械厂;
- 5、自动三重纯水蒸馏器:52-97, 上海亚荣生化仪器厂;
- 6、电子分析天平:上海精天电子仪器厂;
- 7、18号注射针头;
- 8、塑料培养皿: 35mm Nunc, Danmark;
玻璃培养皿: 60mm, 28mm, 35mm;
- 9、层流洁净室:100级—100000级, 苏州绿叶空调净化有限公司;
- 10、直玻璃管(内径 0.75mm、1mm) 华西医科大学仪器生产厂;
- 11、琼脂:20020807, 青岛水产品加工厂生产;
- 12、庆大霉素;
- 13、拉针仪:WPI, USA World Precision Instruments, Inc;
- 14、缎针仪: Narishige, Japan

2.4 方法

2.4.1 2%琼脂制备:

称取 0.2g 琼脂粉, 倒入 25ml 锥形瓶中, 加入 10ml PBS 液。然后在微波炉中加热充分使其充分溶解, 封口高压灭菌, 取出后待冷却到 40~50 度时加入 10 μ l 的庆大霉素, 混匀备用。

2.4.2 装置制作过程:

准备 3 个 3.5x1cm 一次性塑料培养皿，一个做为储液池，一个做为培养池，一个作为废液池。

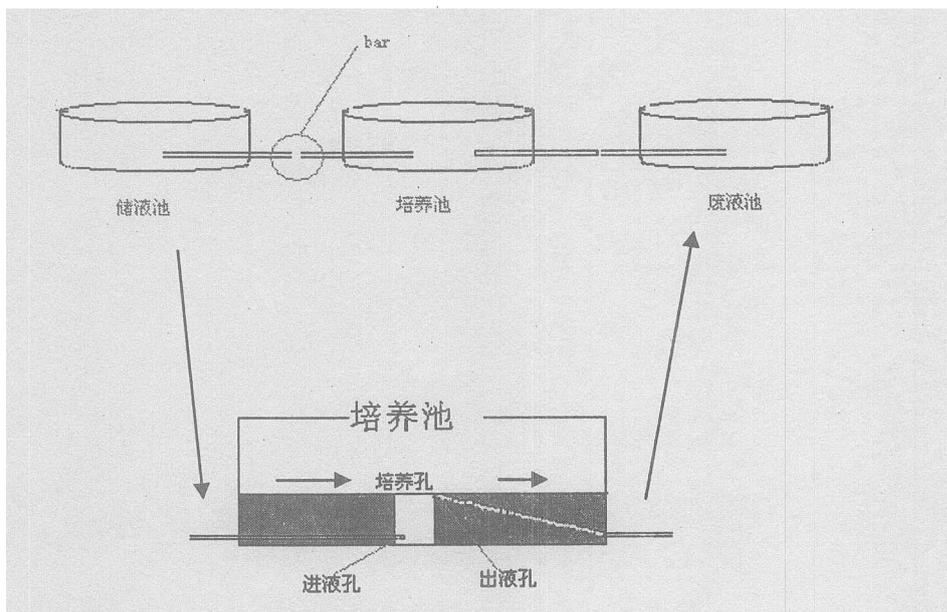
用 18 号针头在储液池平皿的靠近底部的侧面钻孔，孔径与 0.75mm 直玻璃管外径基本相当；废液池做法相同；培养池平皿在两侧的相应位置钻孔备用。

将制备好的琼脂溶液倒入培养池，控制琼脂高度 0.4cm；待琼脂冷却后，按示意图中的培养池所示，在中央处打孔，孔径打制 5mm（形状可以多样化，也可以根据胚胎培养数量的需要多空打制，分组隔离培养）；用 0.75mm 内径的直玻璃管钻出进液管道和出液管道。

限流装置用内径 0.75mm 的直玻璃管在拉针仪上拉制，并在锻针仪上将尖端煅制成与流速相应大小：50 μm ；60 μm ；70 μm 。截取 3cm 左右，通过储液池平皿底部的小孔将其尖端插入储液池，粗端露出少许，由于微管粗端外径与小孔的内径相当因而进出有一定的阻力。培养池的进液孔用 1cm 左右的 0.75mm 内径的直玻璃管连接，出液孔同样处理。

将三个平皿置于一大大玻璃平皿中，使其的外露微管相对接（仅接触），在储液池中加入培养液，液面高度 0.9cm 左右，培养孔中加满培养液，废液池中加入 1~2ml PBS 以覆盖平皿底部微管为准，后放入 37.5°C CO_2 培养箱中平衡检验 24 小时，如流动状态完好，则在储液池中添加培养液使其高度恢复 0.9cm，并抽出废液池的部分液体后，用于培养胚胎。

2.5 装置示意图:



注：箭头指示培养液流动方向

储液池中的新鲜培养液，通过限速微管流进培养池的培养孔；培养孔中的液面达到出液

孔高度时，培养液流进废液池。对流速的限制通过玻璃微管的孔径大小来实现。Bar 处的两管对接是液体流动的关键。培养孔的设计类似于微滴培养中的微滴，可以起到防止胚胎的流失、促进胚胎相互作用、便于观察等作用。2%的琼脂具有较强的硬度，不易破裂，便于打孔，因而选择其作为培养孔的硬性支架。

此培养装置的设计，仅以解决流动控制问题为目的，其中存在着很多不精确的地方如：控速管道并非均匀单一直玻管，液体在流动的过程中存在着流头损失； Δh 在液体流动过程中也是在不断变化的等，都会使最终的结果产生误差。如果要进行实际生产仍必须做相应改进。

第三章 小鼠胚胎的体外培养

引言

胚胎的体外培养是指在将受精卵培养在人工合成的培养液中,使其发育到胚胎的后期阶段的一种实验技术。1949年,Hammond用生理盐水加卵黄将8-细胞的小鼠胚胎培养至囊胚阶段,随后,兔、绵羊、牛的早期胚胎体外培养体系相继建立。近年来,随着卵母细胞体外成熟(IVM)、体外受精(IVF)以及细胞核移植技术的发展,胚胎体外培养(IVC)的方法也在不断的完善,使胚胎体外生产(IVP)成为可能。但就目前而言,IVC技术还不能满足胚胎工程技术发展的需求,体外生产胚胎的质量和大规模生产胚胎的可操作性都还存在着很大缺陷。现在用于胚胎体外培养的方法基本上选用的是微滴培养和开放式培养。这两种方法都属于静态培养系统。但胚胎在体内的生存环境是一个动态变化的环境。1996年美国的胚胎学者Beebe将灌注小室培养方法(一种细胞流动培养方法,1912年伯罗设计)引入胚胎培养。目前,国内外的研究者对动态培养的前景看法不一,更多的研究者则倾向于传统的静态培养模式。但是随着胚胎工程技术的飞速发展,体外规模化生产高质量胚胎已经成为一种趋势。传统的静态培养模式小家小户的特点势必成为胚胎工程技术的瓶颈。动态的流动培养体系在现代细胞产品规模化生产领域已经建立了不可动摇的地位。其在胚胎培养领域的潜力值得人们挖掘。本试验通过自制的流动培养体系,实现了对胚胎的动态培养,相对近似的模拟胚胎在体内的动态环境。通过对流动培养、微滴培养和开放式培养在培养小鼠2细胞胚胎的培养结果比较,来最终判断胚胎培养动态模型建立的可行性。以期为今后IVC技术的改进提供一点参考数据。

3.1 材料与方方法

3.1.1 材料

3.1.1.1 仪器

- (1) 体视显微镜:OLYMPUS. Japan Olympus Optical CO., LTD;
- (2) 倒置显微镜:重光,重庆光电仪器有限公司;
- (3) CO₂培养箱: Forma 3131, USA Thermo Forma CO.;
- (4) 显微操作仪:Leica DM IRB, Germany Leica CO.;
- (5) 图像采集方法:JVC, Japan;

- (6) 电热恒温干燥箱:重庆银河实验仪器有限公司;
- (7) 净化工作台:XSW-CJ-2A标准型, 吴州市绿叶空调净化有限公司
- (8) 立式自动电热压力蒸汽灭菌器:LDZX-40B型, 上海申安医疗器械厂;
- (9) 自动三重纯水蒸馏器:52-97, 上海亚荣生化仪器厂;
- (10) 电子分析天平:上海精天电子仪器厂;
- (11) 塑料培养皿: 35mm Nunc, Danmark;
玻璃培养皿: 60mm, 28mm, 35mm;
- (12) 注射器式微孔滤器:0.22mm, 0.45mm, 美国Pall公司;
- (13) MILLI-Q超纯水纯化系统: F5CN19505, France;
- (14) 离心机:TDL-40B型, 上海安亭科学仪器厂;
- (15) pH计:梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;
- (16) 层流洁净室:100级—100000级, 苏州绿叶空调净化有限公司;
- (17) 自制玻璃吸卵针;
- (18) 离心机 (TDL-40B 型, 上海安亭科学仪器厂);
- (19) 拉针仪:WPI, USA World Precision Instruments, Inc;
- (20) 缎针仪: Narishige, Japan;

3.1.1.2 手术器械

眼科手术剪; 小镊子; 1ml注射器; 自制手术台;

3.1.1.3 主要试剂

- (1) 孕马血清促性腺激素粉剂(PMSG):宁波激素制品厂;
- (2) 人绒毛膜促性腺激素粉剂(hCG):宁波激素制品厂;
- (3) M199(粉):Sigma, M1285;
- (4) 石蜡油:Mineraloil, Sigma, M 8410;
- (5) 丙酮酸钠:Sodium pyruvate, P4652;
- (6) 牛磺酸: T0625;
- (7) HEPES: H3375;
- (8) 乳酸钠:Sodium lactate, L7900;
- (9) 碳酸氢钠:NaHCO₃, S5761;
- (10) 青霉素G钾盐:Penicilin G potassium salt, P4687;
- (11) 硫酸链霉素:Streptomycin sulfate, 51277;
- (12) PBS: ZLI-9062, 北京中山;

3.1.1.4 实验动物

以性成熟昆明系小白鼠(购自重庆中药研究所)为实验动物。雌鼠体重29~32 g, 雄鼠体重33~35 g, 雌雄分笼饲养在常温、自然光照、自由饮水的条件下, 采用全价繁殖颗粒饲料饲养。

3.1.1.5 水牛输卵管

采自北碚屠宰场; 从屠宰场截取整段输卵管, 用温 PBS 液(青霉素 100UL/ML; 链霉素 100 μg/ml) 冲洗一到两遍, 放入盛有 35°C PBS 液中的保温瓶中, 运往实验室备用。

3.1.2 方法

3.1.2.1 液体制备:

冲洗液:

PBS 液(含有青霉素 100UL/ml; 链霉素 100 μg/ml);

胚胎培养液(细胞培养液):

M199(sigma)9.8g, 8%FCS, HEPES 0.2382g, NAHCO₃0.2535g, 牛黄酸 31.3g, 丙酮酸钠 0.011g, 乳酸钠 0.18ml, 青霉素 G 钾盐 0.006g, 硫酸链霉素 0.005g。

石蜡油:

取灭菌石蜡油 40ml, 加 20% (8ml) 的胚胎培养液(不含 FCS), 混匀, 静置后放入离心机, 2500R/S 离心得到饱和的石蜡油, 密封保存, 在 2 周内用完。用前置于 CO₂ 培养箱中数小时, 使其温度和气相充分平衡。

3.1.2.2 小鼠 2 细胞胚胎的获得:

将健康的间情期雌性小白鼠在晚上 19:00 腹腔注射 PMSG 10 IU / 只, 48 h 后, 腹腔注射 hCG 10 IU / 只, 注射 hCG 后即与公鼠按 1:1 合笼。次日 8:00 检查是否形成阴栓; 将有阴栓的小鼠于合笼后 48 小时断颈处死, 固定在手术台上, 用眼科剪取出两侧输卵管, 用 PBS 液多次冲洗后, 置入洁净的制备了若干 100 μl 液滴的 60mm 玻璃培养皿的微滴中, 用两只一次性注射器的针头部分在 15 倍倒置显微镜下小心除去输卵管表面的脂肪, 换液滴清洗两遍之后移入另一干净微滴, 撕开后捡胚。

3.1.2.3 水牛输卵管上皮细胞的获得:

将输卵管伸平在灭菌纱布上, 剪去系膜, 在近子宫端三分之一处的输卵管壶腹两侧

2-3cm 截取输卵管，移入加有生理盐水的 6cm 直径的玻璃平皿中，纵向剖开平铺，用手术剪轻刮内膜；然后在低倍显微镜下选择 0.5cm³ 的相对脱落完好的上皮块，用自制的吸卵针检出后，在洗液中洗涤 4-5 遍，尽量减少原液的吸入，从而减少污染的发生。洗涤完的理想的上皮脱落块移入 3.5x1cm 的一次性平皿中 38.5^oC；5%CO₂ 条件下进行培养，每个平皿放 6-8 个上皮块。18 小时后观察上皮细胞游走情况，如游走的情况较为理想就可用吸卵针将上皮块吸出；反之在 24 小时时将上皮块除去。待 50%的输卵管上皮细胞已经开始贴壁生长时进行第一次换液，换液时将平皿稍稍倾斜再用灭菌移液枪吸出二分之一的原液，同时补充新鲜的培养液。之后每 48 小时换液三分之二。

3.1.2.4 微滴培养：

在 3.5x1cm 的一次性培养皿上用移液枪做 50 μL 微滴 3 个，加入 2ml 处理过的石蜡油，放入 37^oC CO₂ 培养箱平衡 1h；然后取出，分别将 10 枚 2 细胞小鼠胚胎加入一个微滴中，再在 37^oC CO₂ 培养箱培养，每 48 小时换液，分别在培养 12h、24h、48h、72h 观察，记录。

3.1.2.5 流动培养：

在培养池的培养孔加入 3/4 培养液；废液池加入 1ml 液体铺满平皿底部。置于 37^oC CO₂ 培养箱平衡 1h；取出，在培养孔加入 30 枚小鼠 2 细胞胚胎。放入 37^oC CO₂ 培养箱培养，24 小时补液 1ml (0.1ml/h, 0.2ml/h 组 12 小时补液一次分别补 1ml 和 2ml，同时从废液池中取出相同液体量)。分别在培养 12h、24h、48h、72h 观察，记录。

3.1.2.6 开放式培养

取一干净的 3.5x1cm 一次性塑料培养皿，在其中加入 2-3ml 的培养液，在培养箱中平衡 1h 后加入 2 细胞胚胎，分别在培养 12h、24h、48h、72h 观察，记录。

3.1.2.7 输卵管上皮细胞共培养：

在各组培养液中加入输卵管上皮细胞，分别在培养 12h、24h、48h、72h 观察，记录；

3.2 试验设计

3.2.1: 试验 1: 比较 0.05ml/h、0.1ml/h、0.2ml/h 三种流速对小鼠 2 细胞胚胎体外发育囊胚率的影响；每组培养纵向重复 2 次,取平均值参与最终比较；

3.2.2: 试验 2: 观察比较微滴培养、流动培养和开放培养对小鼠 2 细胞胚胎体外培养的结果；每组培养纵向重复 2 次,取平均值参与最终比较；

3.2.3: 试验 3: 比较三种培养方法结合输卵管上皮细胞共培养时对小鼠 2 细胞胚胎发育的促进；每组培养纵向重复 2 次,取平均值参与最终比较；

3.3 实验结果

3.3.1 0.05ml/h、0.1ml/h、0.2ml/h 三种流速对胚胎囊胚率的影响结果比较:

表一 适合流量的筛选: (培养 72 小时)

Table 1 To choose the fit flow rate: (after culture in vitro for 72h)

	胚胎培养数(枚)	囊胚数(率)
0.05ml/h	30	22 (73.3%)
0.1ml/h	30	15.5 (51.6%)
0.2ml/h	30	10.5(35%)

从表一的结果可以看出, 培养液流动的速度对胚胎的发育影响显著。流速为 0.05ml/h 时对胚胎的培养较为合适, 三种流速下囊胚率结果差异显著 ($P<0.01$)。

3.3.2 微滴培养、流动培养和开放培养对小鼠 2 细胞胚胎培养的结果比较:

表二 开放式培养结果:

Table 2 The results of the group of the open culture system

	胚胎个数 (枚)	时间			
		12h	24h	48h	72 h
胚胎发育情况	30	4cell/23.5	囊胚/2	囊胚/12.5	孵化囊胚/7.5
		8cell/4	16cell/13.5	桑椹胚/12.5	囊胚/15
		2cell/2.5	32cell/12	32cell/1.5	桑椹胚/1
			8cell/0.5		
退化胚胎数 (枚)	0	0	2	3.5	6.5

注: 胚胎分裂球部分或全部碎裂即视为胚胎退化

表三 微滴组培养结果:

Table 3 The results of the group of the micro-drop culture system

	胚胎个数 (枚)	时间			
		12h	24h	48h	72 h
胚胎发育情况	30	4cell/25	囊胚/0.5	囊胚/9.5	孵化囊胚/6.5
		8cell/3	16cell/13	桑椹胚/13	囊胚/15
		2cell/2	32cell/13.5	32cell/1.5	桑椹胚/2
				16cell/0.5	
退化胚胎数 (枚)	0	0	3	5.5	6.5

注: 胚胎分裂球部分或全部碎裂即视为胚胎退化

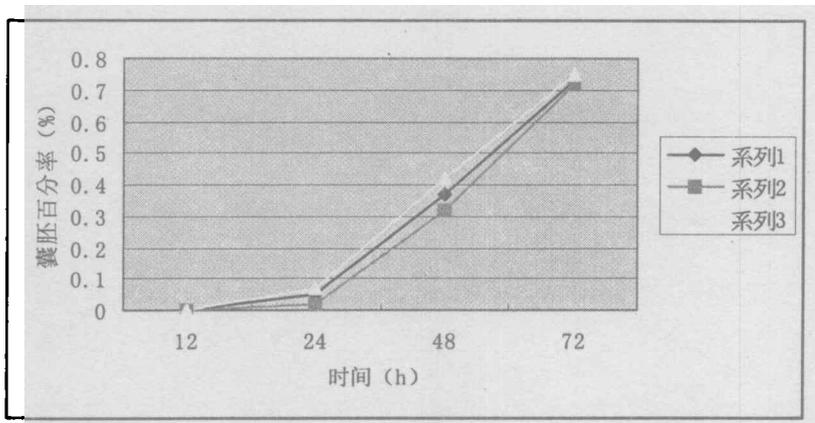
表四 流动培养组: (流速 0.05ml/h):

Table 4 The results of the group of flow culture system (at 0.05ml/h)

	胚胎个数 (枚)	时间			
		12h	24h	48h	72 h
胚胎发育情况	30	4cell/22	囊胚/1.5	囊胚/11	孵化囊胚/7.5
		8cell/3	桑椹胚/1	桑椹胚/11	囊胚/14.5
		2cell/5	32cell/12	32cell/4.5	桑椹胚/3
			16cell/14.5		
退化胚胎数 (枚)	0	0	1	3.5	5

注: 胚胎分裂球碎裂或分裂极不均匀即视为胚胎退化

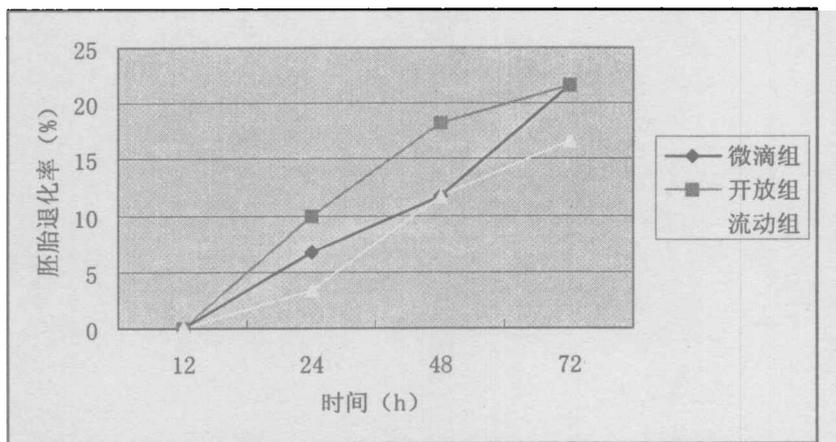
根据表二、表三、表四结果中的胚胎发育情况，统计出不同培养时间三组实验囊胚率的线型图比较：



图一 囊胚率比较
fig. 1 blastocyst rate comparation

由图可知：微滴组体外培养时，囊胚出现时间上要较开放组和流动组晚，三组中开放式培养组的囊胚率相同培养时间时最高，流动组第二，微滴组相对较低；

根据表二、表三、表四结果中的胚胎退化情况，统计出不同培养时间内胚胎退化率的在三组实验的线型图比较：



图二 胚胎退化率比较
fig. 2 degeneration rate comparcing

表六显示：流动培养时胚胎的退化率变低。本试验中，微滴组的退化率最高，其次是开放组。

3.3.3 试验 3 结果:

表七 输卵管上皮细胞对三种培养方法的影响:

Table 7: The influence of the oviduct epithelial cell to the three culture system

	培养胚胎数	12h 囊胚数(率)	24h 囊胚数(率)	48h 囊胚数(率)	96h 囊胚数(率)
微滴组+输卵管上皮细胞	30	0 (0%)	1(3.3%)	11(36.7%)	21.5 (71.7%)
流动组+输卵管上皮细胞	30	0 (0%)	3(10%)	16(53.3%)	24 (80%)
开放组+输卵管上皮细胞	30	0 (0%)	2.5(8.3%)	13(43.3%)	23(76.7%)

表七结果表明：水牛输卵管上皮细胞在开放式培养方法中对囊胚率的贡献值为： $76.7\% - 75\% = 1.7\%$ 个百分点；在流动培养方法中对囊胚率的贡献值为： $80\% - 73.3\% = 6.7\%$ 个百分点；而在微滴培养中的贡献相对不明显($71.7\% - 71.7\% = 0$)。流动培养方法中输卵管上皮细胞对囊胚率的贡献值相对较高。

3.4 讨论

3.4.1 在流动式培养体系中培养液流动的速度对早期胚胎发育的影响

胚胎之所以能在体内很好发育,主要原因在于保证其正常发育的环境是一个既能合理提供营养又能及时清理废物的动态培养状况。然而,人们培养胚胎的一贯做法是使用一种培养液培养到底。这容易导致营养物质供应不平衡,更大危害在于导致过氧化物等毒性物质积累和胚胎自身代谢废物增加,致使胚胎发育发生阻断。2002年 Hickman, DL 等,通过提供静态和动态媒介环境的装置,分别培养移植前的小鼠早期胚胎来比较静态的微滴培养方法与动态培养方法。结果显示:胚胎发育成囊胚(blastocyst)阶段在两个方法的比率并无明显差异,但在静态微装置环境比对照组产生明显较多桑葚体。因此作者考虑是否动态媒介环境能模拟输卵管内的环境而改善胚胎活性,并指出在动态媒介环境中物质传输速率,及脉动式液体流在今后的动态方法研究中应得到重视。通过本试验 1 的研究,显示培养液流速对胚胎的培养效果影响显著;在培养液以 0.05ml/h 流过培养孔时,能够较好的支持小鼠 2 细胞胚胎发育到囊胚阶段。分析:胚胎之间可能分泌一些相互促进彼此发育的物质,流速过快使这种促进物质损失,有可能影响胚胎发育的代谢平衡。当流速极慢时,如 0.05ml/h,就不会对胚胎群发育过程中所建立起的微环境造成太大的冲击。因而获得较好的培养效果。

3.4.2 三种培养方法对早期胚胎发育效果的比较

在三种培养方法的比较试验中,发现开放式培养组囊胚率最好,流动培养方法,较微滴培养方法的囊胚率高,三组中胚胎的退化率相对较低;此结果与 Stephanie Raty, Eric M. Walters 等 2004 年在研究微通道培养小鼠卵母细胞和胚胎时所发现的结果基本相同。证明:在合适流速下,流动培养法也是一种能够较好的支持小鼠胚胎发育到囊胚阶段的培养方法。本试验中微滴组的培养效果不如其他报道中的好,分析原因可能是试验中所用到的石蜡油,处理不理想,对胚胎的发育起到了负面作用,但其原因未能查清;从生理角度分析:超排小鼠 48 小时后冲出的 2 细胞胚胎绝大多数都通过了胚胎发育阻滞期,胚胎自身基因活性已经启动,随着胚胎代谢活动逐渐增强,各类代谢产物的量积累速度不同,48 小时的换液间隔可能过长,对胚胎的发育也有影响。胚胎退化原因可能是胚胎自身基因活性未能完全打开、胚胎毒性物质的积累或是营养的耗尽等。流动培养组由于能有效的防止胚胎废弃物的堆积和营养的耗尽,因而较静态培养方法的胚胎退化率低。

3.4.3 输卵管上皮细胞对三种培养方法的影响

体细胞共培养是一种很好的克服发育阻滞，提高胚胎发育力的手段，其中输卵管上皮细胞的应用最为广泛。主要是因为：输卵管上皮细胞可能分泌一些对早期胚胎有利的细胞因子；输卵管上皮细胞可代谢降解胚胎发育过程中产生的有毒物质，如铵、次黄嘌呤和氧自由基等。许多研究者发现牛的输卵管上皮细胞能够与多种动物的胚胎进行共培养，没有种的差异性。实验 3 的设计就是用来比较输卵管上皮细胞在三种培养方法中应用时，对胚胎培养效果的贡献值。由表七可知：水牛输卵管上皮细胞在开放式培养方法中对囊胚率的贡献值为： $76.7\% - 75\% = 1.7\%$ 个百分点；在流动培养方法中对囊胚率的贡献值为： $80\% - 73.3\% = 6.7\%$ 个百分点；而在微滴培养中的贡献相对不明显（ $71.7\% - 71.7\% = 0$ ）。流动培养方法中输卵管上皮细胞对囊胚率的贡献值相对较高。分析：可能原因是流动培养装置中模拟了输卵管内环境，输卵管上皮细胞膜表面的机械门通道的打开依赖于培养液流动所产生的剪切力，从而促进了输卵管上皮细胞生长以及细胞因子的分泌能力，间接的提高了共培养胚胎的发育力。在微滴培养方法中对囊胚率的贡献不明显。这与其他研究者的结果不一致，分析：原因一、可能是选择的共培养方式不一样：由于输卵管上皮细胞体外铺层时间较长，所以本试验没有选用输卵管上皮细胞铺层后共培养，而是只将胚胎同一定浓度的输卵管上皮细胞混在一起培养，这样输卵管上皮细胞所分泌的促进胚胎发育的有益因子的浓度就较低，影响共培养效果；原因二、实验条件的差异，本试验中选用的石蜡油对胚胎的培养可能起到了负面作用；原因三：微滴中培养的细胞密度过大，对培养液中营养成分的消耗而引起对胚胎的负面效应抵消了其对胚胎发育的促进作用。

3.5 结论

3.5.1 本试验中自制创作的早期胚胎动态培养装置能够使小鼠的 2 细胞胚胎发育到囊胚阶段。

3.5.2 本试验条件下, 以 0.05ml/h 流速的动态培养装置与传统的开放式培养和微滴培养系统相比, 使小鼠的 2 细胞胚胎发育到囊胚阶段的比率相近, 但是, 胚胎退化率明显降低。

3.5.3 输卵管上皮细胞在流动培养装置中对胚胎发育的贡献值要高于微滴培养方法和开放式培养方法。

综上所述, 我们可以通过自制的流动培养装置实现对胚胎的动态培养, 在适宜流速下能够较好的支持胚胎体外发育。尽管在本试验中动态的流动培养在效果上同静态培养相比并没有明显的差别, 但是从发展的角度来看, 由于动态的培养模式能够适用于大规模生产体外胚胎, 因而必将成为将来的培养方法的发展方向。建立、完善和改进动态培养装置对将来胚胎的体外培养意义重大。

参考文献

- [1] 桑润滋主编. 动物繁殖生物技术[M].北京: 中国农业出版社,2002,67~80
- [2] Lobo SM, Marzluff,Seufer AC, et al. Localization and expression of U1 RNA in early mouse embryo development. *Dev. Biol.*1988,127:349~361
- [3] Aoki F, Worrada DM and Schultz RM. Regulation of transcriptional activity during the first and second cell cycles in the preimplantation mouse embryo. *Dev. Biol.*1997,181:296~307
- [4] Memili E, Dominko T and First NL. Onset of transcription in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 1989,51:36~41
- [5] Kopečný V, Flechon JE, Camous S, et al. High-resolution autoradiographic studies of nucleogenesis and genome reactivation during embryogenesis in pig, man and cattle. *Reprod. Nutr. Dev.* 1989,29:589~600
- [6] Crosby IM, Gandolfi F and Moor RM. Control of protein synthesis during early cleavage of sheep embryos. *J. Reprod. Fert.*1988,82:769~775
- [7] Braude P, Bolton V and Moor S. Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature.* 1988,332:459~461
- [8] De Sousa PA, Caveney A, Westhusin ME, et al. Oogenetic and zygotic gene expression directing early bovine embryogenesis: a review. *Mol. Reprod. Dev.*1998,51:112~121
- [9] Bowmanp, McLaren A. Cleavage rate of mouse embryos in vivo and in vitro. [J]. *J Embryol Exp*,1970,24:203
- [10] 李子义, 谭景和 昆明小鼠早期胚胎发育时程 中国兽医学报 1999,19(6):600
- [11] 菅原七郎 哺乳动物发育工程试验方法[M]. 南京. 南京农业出版社, 1994, 290~291
- [12] Fisher B and Bavister BD. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamster and rabbits. *J. Reprod. Fertil.* 1993,99:673~679
- [13] Dungleison GF and Kaye PL. Insulin regulates protein metabolism in mouse blastocysts. *Mol. Reprod. Dev.*1993,36:42~48
- [14] Gardner DK and Leese HJ. Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism in vitro. *J. Reprod. Fertil.*1990,88:367~368
- [15] Edwards LJ and leese HJ. Glucose transport and metabolism in rabbit oviduct epithelial cell. *J.*

Reprod. Fertil.1993,99:585~591

[16] Nichol R, Hunter RHF, Gardner DK, Leese HJ and Cooke GM. Concentrations of energy substrates in oviductal fluid and blood plasma of pigs during the peri-ovulatory period. J. Reprod. Fertil. 1992,96:699~707

[17] Leese HJ. Metabolic control during preimplantation mammalian development. Human Reproduction Update 1995,1:63~77

[18] Adrienne E, Crosier, Peter W, et al. Ultrastructural morphometry of bovine compact morulae produced in vivo or in vitro. Biol. Reprod 2000,62:1459~1465

[19] Hyttel P, Viuf D, Laurincik J. et al. Risks of in vitro production of cattle and swine embryos: aberrations in chromosome numbers. ribosomal RNA gene activation and perinatal physiology. Hum. Reprod. 2000, 15(Suppl 5): 87~97.

[20] Niemann H, Wrenzycki C Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development. Theriogenology, 2000, 53: 21~34.

[21] Emright B.P, Lonergan P, Dinnyes A. Culture of in vitro produced bovine zygotes in vitro vs in vivo: implications for early embryo development and quality. Theriogenology, 2000, 54:659~673.

[22] Sinclair K D, Young LE, Wilmut I, et al. In-utero overgrowth in ruminants following embryo culture: lessons from mice and a warning to men. Hum. Reprod. 2000, 15(Suppl 5): 68~86.

[23] Lape M. Mechanisms for managing cellular and homeostatic stress in vitro. Theriogenology, 2001, 55: 225~236.

[24] Koji Yoshioka, Chie Suzuki, Atsushi Tanaka, et al. Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. Biol. Reprod. 2002, 66 :112 -119

[25] Thompson JG, Menaughton C, Gasparrini B, et al. Blastulation of bovine embryos cultured in vitro. J. Reprod. Fertil,2000,118:47~55

[26] Alexandre J, Harvey, Karen L, et al. Redox regulation of early embryo development. Reproduction,2002,123:553~565

[27] Tenneille E, Ludwig, Jayne M, et al. Relationship between development metabolism and mitochondrial organization in 2-cell hamster embryos in the presence of low levels of phosphate.

Biol. Reprod. 2001,65:1648~1654

[28] Ludwig T, Elane M, Bavister BD. Differential effect of hexoses on hamster embryo development in culture. Biol Reprod 2001,64:1366~1374

[29] C.F.Rosenkrans. Development of bovine embryos in vitro as affected by energy substrates. Biol Reprod.1993,49:459~463

[30] J.E.Swain, C.L.Bormann, M.B.Wheeler, et al. Use of energy substrates by various stage preimplantation pig embryos produced ni vivo and in vitro. Reproduction,2002,123:253~260

[31] Liza Butcher. Metbolism of pyruvate by the early human embryo. Biology of reproduction,1998,58:1054~1056

[32] O.Fallon,Wrightw.J. Pyruvate revisted:a nonmetabolic role for pruvate in preimplatation embryo development. Theriogenology,1995,43:288

[33] Gardner, Lane M. The 2-cell block in CF-1 mouse embryos is association in tricarboxylic acid cycle activity alleviation of the 2-cell blocks associated with the restoration of in vivo metabolic pathway activity. Biology of Reproduction,1993,49:52

[34] Takagi Y, Mori K, Tomizawa M, et al. Development of bovine oocytes matured fertilized and cultured in a serum-free, chemically defined medium. Theriogenology,1991,35:1197~1207

[35] Rebecca L, Krisher, Michelle Lane, et al. Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi-difined and defined culture media. Biol. Reprod.1999,60:1345~1352

[36] Chatct CL, Ziomek CA, Bavister BD, et al. Animproved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. J. Report Fertil.1989,86:679~688

[37] Farin C.E,James BE. Effect of early restriction on development of bovine embryos produced in vitro. Biol. Reprod,1996,54:137

[38] 卢克涣, 卢晟盛 不同血清种类及其深度对牛卵母细胞体外受精的影响 广西农业大学学报。1994, 1: 8~12

[39] 刘东军,杨东山, 旭日干等 培养条件对牛体外受精胚胎核仁及线粒体发育的影响 2003, 38(3):38~42

[40] Ohno M, Aoki N., Sasaki H. Allele-specific detection of nascent transcripts by fluorescence in situ hybridization reveals temporal and culture-induced changes in IGF 2 imprinting during preimplantation mouse development. Genes Cells, 2001, 6(3): 249~259

- [41] JDusan F, Gabika K, Pavol R, et al. Inhibitory effect of IGF-I on induced apoptosis in mouse preimplantation embryos cultured in vitro[J]. *Theriogenology*, 2004, 61(4): 745-755.
- [42] Palma.G.A., Muller.M., Brem.G. Effect of insulin-like growth factor I(IGF-I) at high concentrations on blastocyst development of bovine embryos in vitro as affected by energy substrates. *Biol. Reprod.* 1993,49:459-462
- [43] H.J.Herndez, S.Sirisathien. Offspring resulting from direct transfer of cryopreserved bovine embryos produced in vitro in chemically defined media. *Animal reproduction science.* 1995,52:1410-1417
- [44] Watson A J, De Sousa P, Caveney A, et al. Impact of ovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. *Biol. Reprod.* 2000, 62: 355-364.
- [45] Dardik, Schultz, Blastocoel expansion in the preimplantation mouse embryo: stimulatory effect of TGF- α and EGF. *Development* 1991,113: 919-930.
- [46] Linares HA, Larson DL. Early differential diagnosis between hypertrophic and nonhypertrophic healing. *Invest Dermatol*,1974,62:514-516.
- [47] Baltimat L I, Liu H C, Mele C, et al. Autologous endometrial coculture in patients with repeated failures of implantation after IVF-ET. *J Assist Reprod Genet*, 1999, 16(3): 121-127.
- [48] Steven D, Spandorfer, Larry B, et al. Autologous Endometrial coculture in patients with a previous history of poor quality embryos. *J Assist Reprod Genet*, 2002, 19(7): 309-312
- [49] Amparo M, Juan A, Garcia V, et al. Clinical experience and perinatal outcome of blastocyst transfer after coculture of human embryos with human endometrial epithelial cells: 5-year follow-up study. *Fertil Steril*, 2003, 80(5):1162-1168
- [50] Rieger D, Grisart B, Semple E, et al. Comparison of the effects of oviductal cell co-culture and oviductal cell conditioned medium on the development and metabolic activity of cattle embryos. *J Reprod Fertil*, 1995, 105(1), 91-98
- [51] Ouhibi N, Hamidi J, Cuillaud J, et al. Co-culture of 1-cell mouse embryos on different cell supports. *Hum Reprod*,1990,5:737-743
- [52] Lanzendorf S E, Mayer J F, Toner J, Oehninger S, Saffan DS, Muasher S. Pregnancy following transfer of ooplasm from cryopreserved-thawed donor oocytes into recipient oocytes. *Fertil Steril*,

1999,71(3): 575~577.

[53] Menezo YR, Guerin JF, Czyba JC: Improvement of human early embryo development in vitro by coculture on monolayers of vero cell. Biol Reprod 42:301,1990

[54] Andoh K, Mizunuma H, Liu X, et al. A comparative study of fixed-dose, step-down, and low-dose step-up regimens of human menopausal gonadotropin for patients with polycystic ovary syndrome[J]. Fertil Steril, 1998,70(5): 840-846

[55] B.Marquant-Leguienne, P.Humblot. Practical measures to improve in vitro blastocyst production in the bovine. Theriogenology 1998,49:3~11

[56] Bavister B. Role of oviductal secretions in embryonic growth in vivo and in vitro. Theriogenology,1988,29:143-154

[57] 李逸平 哺乳类早期胚胎发育阻滞的形成与突破 细胞生物学杂志。1992, 14(4); 153, 157

[58] Desai N, Goldfarb J. Co-culture human embryos maybe subjected to widely different microenvironments: pattern of growth factor cytokine release by Vero cells during the co-culture interval. Hum. Reprod, 1998,13:1600~1605

[59] Watson A J, Hogan A, Hahnel A, et al. Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation bovine embryo. Mol Reprod Dev, 1992, 31:87~95

[60] 李逸平, 沈虹, 顾正等. 推进早期胚胎发育正常调控过渡的输卵管细胞因子的初步研究 动物学研究 1997,18(1):85~92

[61] Joo BS, Kim MK, Na YJ, et al. The mechanism of action of coculture on embryo development in the mouse model:direct embryo-to-cell contact and the removal of deleterious components. Fertil Steril, 2001, 75(1): 193-9.

[62] David K.Gardner,Michelle Lane,et al. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome:towards a single blastocyst transfer. Fertil Steril,2000,73(6):1155-1158.

[63] Brinster R L. A Method for in vitro cultivation of mouse ova from two-cell to blastocyst. Exp Cell Res, 1963,32(1) :205~208

[64] 李志勇 细胞工程 北京 科学出版社 2003 .2

[65] 徐永华主编, 动物细胞工程, 北京: 化学工业出版社, 2003

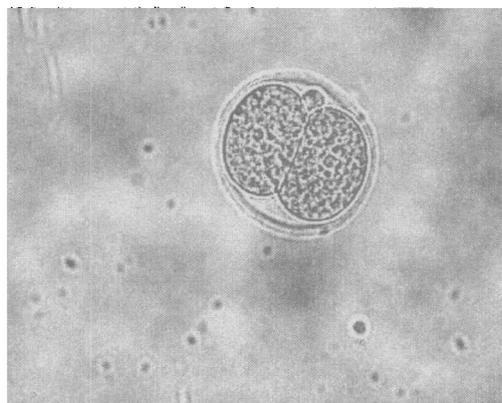
[66] 程宝鸾主编, 动物细胞培养技术, 广州: 华南理工大学出版社, 2000

[67] 范代娣, 动物细胞工程, 北京: 化学工业出版社, 2003

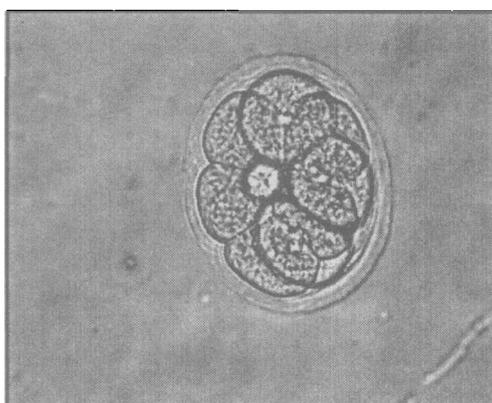
- [68] 赵永贞, 郑新民, 曹斌云 一种早期胚胎体外培养新方法的建立 遗传 2004 26(3), 364~366
- [69] Beebe D J, Wheeler M B, Zeringue H, et al. Microfluidic technology for assisted reproduction[J] The riogenology, 2002, 57(1): 125~136.
- [70] Lim JM, Reggio BC, Godke RA, Hansel W. Perifusion culture system for bovine embryos: improvement of embryo development by use of bovine oviduct epithelial cells, an antioxidant and polyvinyl alcohol . Reprod Fertil Dev. 1997;9(4):411-8.
- [71] Hickman, D. L., D. J. Beebe, S. L. Rodriguez-Zas, and M. B. Wheeler. 2002. Comparison of Static and Dynamic Medium Environments for the Culture of Preimplanation Mouse Embryos. Comparative Medicine,2002, 52:122-126
- [72] Jennifer Kohout, Eric Walters, Matthew B.Wheeler. Dynamic culture system for pig embryos which utilizes microfluidic technology. The Riogenology 2002 58:158~162

附录

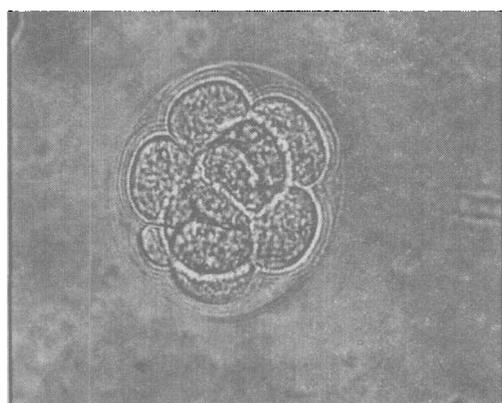
试验图片:



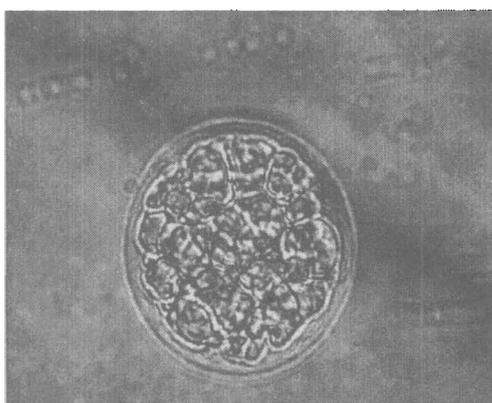
小鼠 2 细胞胚胎



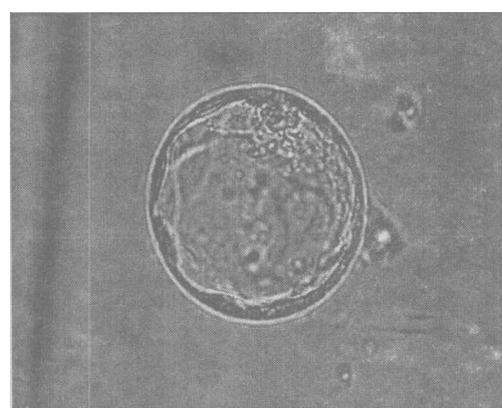
小鼠 16 细胞胚胎



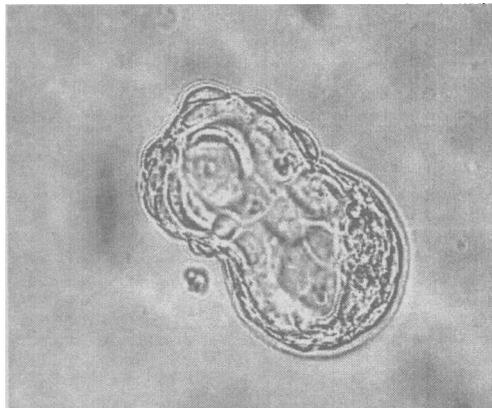
32 细胞胚胎



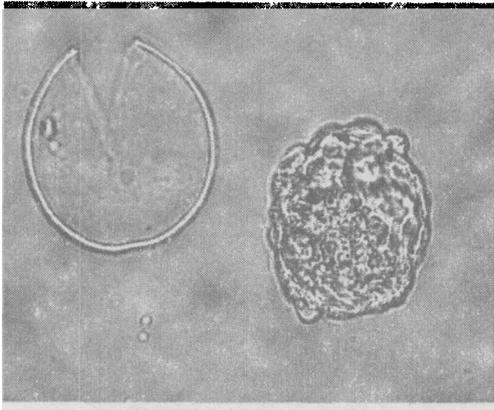
小鼠桑葚胚



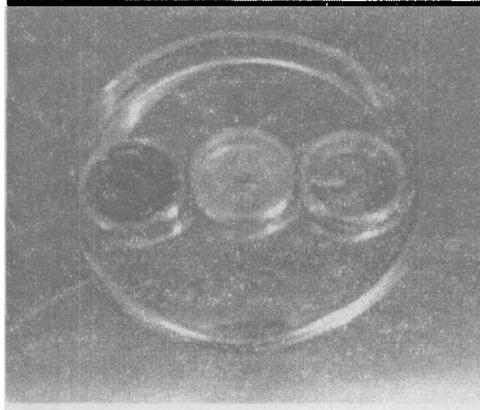
囊胚



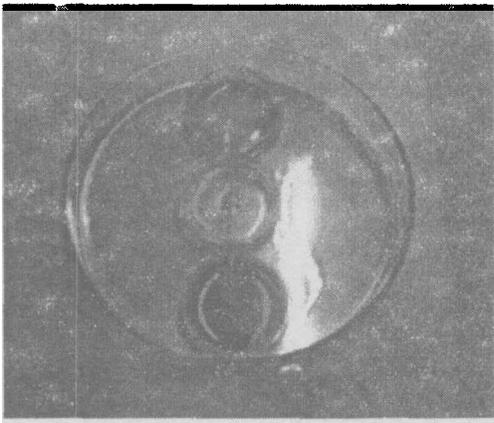
孵化囊胚



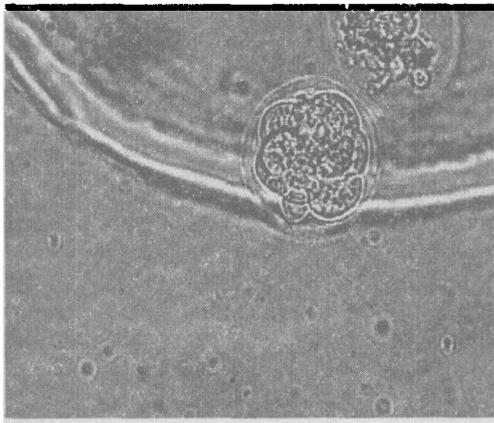
孵出囊胚



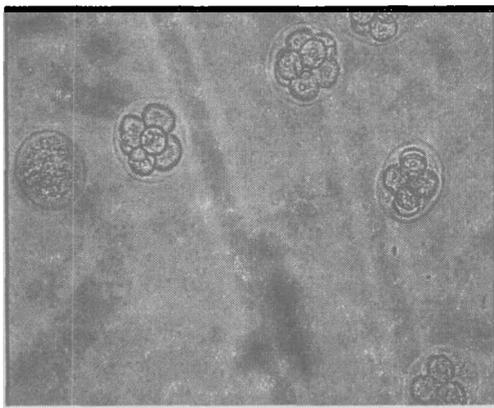
流动培养装置



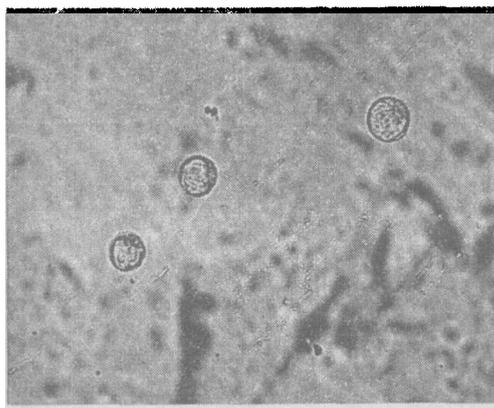
流动培养装置



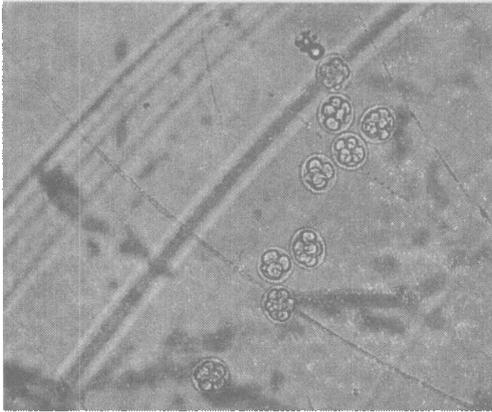
流动培养致密桑葚胚



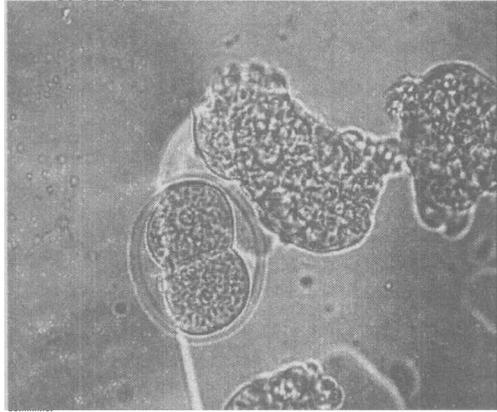
开放式培养 24 小时



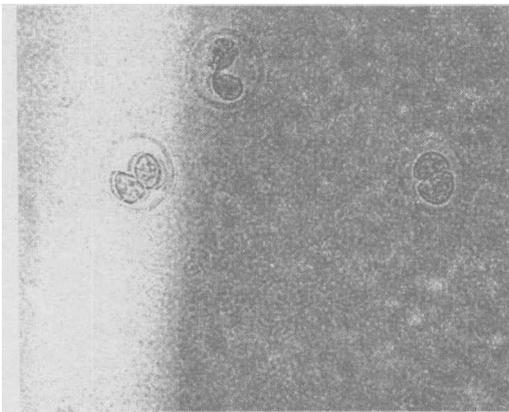
开放式 72 小时



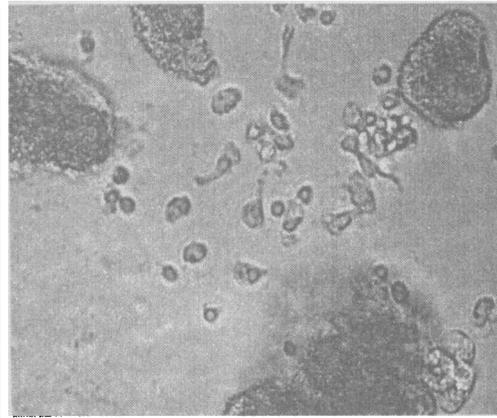
微滴组 24 小时



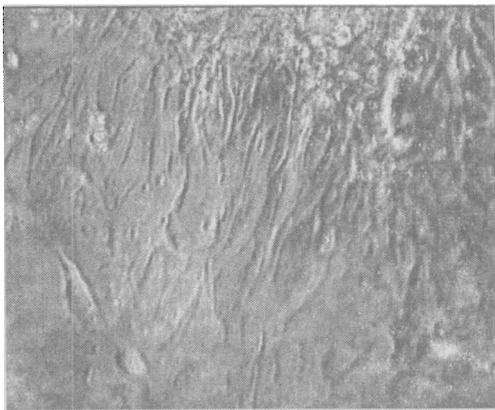
输卵管上皮细胞共培养



流动培养 (污染)



输卵管上皮细胞



输卵管上皮细胞

致谢

三年的研究生生活犹如白驹过隙，一晃而过。昨天仍带有一丝稚嫩的我，现在就像一只刚刚破茧而出的蝴蝶，信心万丈，欲待振翅直飞。

饮水当思源，导师李跃民教授三年来谆谆教导和无微不至的关怀，给了我得以蜕变的力量！他严谨细致、一丝不苟的作风也一直是我和学习的榜样。

感谢课程老师张家骅教授，实验室的魏学良老师、王鲜忠老师和陈老师在我做论文的过程中，为我答疑解惑，排忧解难，使我能够顺利的完成毕业论文，在此表示衷心的感谢。

我还要感谢我的同门：武建中、唐业刚、郭海英、杨春艳、周洪彬、孙明辉、曹胜兰、包垒、张力等。从遥远的家乡来到这个陌生的城市里，使我找到了家的感觉，在我遇到困难的时候给我无私的帮助。转眼我们就要各奔前程，但愿好人都会一生平安。

感谢我的家人，焉得谖草，言树之背，养育之恩，无以回报，你们永远健康快乐是我最大的心愿。

在论文即将完成之际，我的心情无法平静，从开始进入课题到论文的顺利完成，有多少可敬的师长、同学、朋友给了我无言的帮助，在这里请接受我诚挚的谢意！

发表论文

1. 水牛输卵管上皮细胞培养研究. 黑龙江动物繁殖,2005, 12(4): 10~11
2. 水牛卵母细胞孤雌激活及孤雌胚与体外受精胚发育比较. 中国草食动物,2006, 2: 18~20
3. 血清对水牛卵母细胞体外成熟、体外受精及早期胚胎的影响. 动物医学进展, 2005, 11: 94~97