

分类号:

密 级:

单位代码: 10019

学 号: S02390

# 中国农业大学

硕士学位论文

**小鼠体外受精及早期胚胎体外培养方法的建立**

**Establishment of method to culture early mouse embryo and  
fertilization in vitro**

研 究 生: 陈悦洲

指 导 教 师: 崔 胜 教授

申 请 学 位 类 别: 理学硕士

专 业 领 域 名 称: 生理学

研 究 方 向: 生殖与发育调控

所 在 学 院: 生物学院

2005 年 6 月

# 独创性声明

本人声明所提交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，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，也不包含为获得中国农业大学或其它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了谢意。

研究生签名： 陈学刚

时间： 2005年6月20日

# 关于论文使用授权的说明

本人完全了解中国农业大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业大学可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

研究生签名： 陈学刚

时间： 2005年6月20日

导师签名： 崔胜

时间： 2005年6月20日

硕士学位论文题目：

**小鼠体外受精及早期胚胎体外培养方法的建立**

陈悦洲

指导教师：崔胜教授

学科专业：生理学

申请学位类别：理学硕士

论文提交日期：2005年5月

论文答辩日期：2005年6月

学位授予单位：中国农业大学

答辩委员会主席：

## 摘 要

体外受精和胚胎培养在医学、生物学等相关领域已得到广泛应用，但体外受精和胚胎培养体系仍有待于进一步完善。为了建立更为简单、高效的胚胎体外受精和胚胎培养体系，提高体外发育的胚胎质量。本研究比较了不同培养体系对昆明小鼠胚胎体外发育的影响，观察了不同品系的小鼠精子对体外受精和胚胎发育的影响，并运用共培养对胚胎体外培养体系进行优化；此外，还着重研究了雌激素对小鼠早期胚胎发育的影响。

实验一：对于昆明小鼠体外受精和早期胚胎体外培养的研究结果表明，mKSOM 培养液能很好支持昆明小鼠合子体外发育至囊胚；采用 B6D2F1 (C57BL/6 × DBA/2) 小鼠的精子进行体外受精，其受精率、囊胚率和囊胚总细胞数显著高于昆明小鼠 (KM) 的精子。

实验二：采用小鼠子宫上皮细胞与胚胎共培养，观察了共培养对小鼠早期胚胎体外发育的影响。结果表明，胚胎共培养明显促进了体外受精后小鼠胚胎的卵裂、孵化，同时囊胚总细胞数也有显著提高。

实验三：采用 RT-PCR 和免疫细胞化学方法检测了不同时期小鼠胚胎雌激素受体  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) 的表达，并研究了雌激素对小鼠早期胚胎体外发育的影响。结果表明，早期的小鼠胚胎就有 ER $\alpha$  的表达，雌激素对早期胚胎发育的调节需要上皮细胞的参与。

综上所述，该研究建立了更为稳定、高效的昆明小鼠体外受精及胚胎体外培养体系，同时表明雌激素对早期胚胎发育的调节需要上皮细胞的参与。

关键词：昆明小鼠 (KM)，体外受精，子宫上皮细胞，胚胎共培养，雌激素受体  $\alpha$  (ER $\alpha$ )

## Abstract

In vitro fertilization and embryo culture have been widely used in the field of medicine and biology, but they still need further optimize. The purpose of this study is to establish optimal, effective system for in vitro fertilization and embryo culture and advance the quality of embryo. The effects of culture media, sperm of different strains and coculture with somatic cells on early mouse embryo development was evaluate. Especially, the effects of  $17\beta$ -estradiol on early mouse embryo development were observed.

Experiment 1. The results from mouse embro culture and in vitro fertilization showed that zygotes of KM (Kunming Mouse) can be well development in mKSOM medium. The percentages of in vitro fertilization, blastocyst formation and total cell number of blastocyst with the sperm of B6D2F1 (C57BL/6  $\times$  DBA/2) were much higher than that with the sperm of KM.

Experiment 2. The mouse embryos fertilized in vitro were cocultured with monolayer of mouse uterine epithelial cells, and the effects of coculture were evaluated by the embryo cleavage rate, blastocyst hatched rate and total cell number of blastocyst. The results showed that coculture with uterine epithelial cells can promote the development of early mouse embryos fertilized in vitro.

Experiment 3. We investigated the expression of estrogen receptor alpha ( $ER\alpha$ ) in preimplantation mouse embryos by RT-PCR and immunocytochemistry, and the effects of  $17\beta$ -estradiol on early embryo development were examined. The results showed that  $ER\alpha$  is expressed in early mouse embryos, but the regulation of  $17\beta$ -estradiol during the early mouse development depends on the uterine epithelial cells.

All the results above showed that the method to culture early mouse embryo and fertilization in vitro has been established, and also hint that the regulation of  $17\beta$ -estradiol during the early mouse development depend on the uterine epithelial cells.

**Key words:** Kunming mouse (KM); In vitro fertilization; Uterine epithelial cells; Embryo coculture; Estrogen receptor alpha ( $ER\alpha$ )

## 略 缩 表

APES	3-aminopropyl-triethoxysilane	3-氨基丙基三乙氧基硅烷
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate	环腺苷一磷酸
DAB	3, 3'-diaminobenzidine	二氨基联苯胺
DEPC	Diethyl Pyrocarbonate	焦碳酸二乙脂
DMSO	Dimethylsulfoxide	二甲基亚砷
DTT	1,4-Dithiothreitol	二硫苏糖醇
EB	Ethidium bromide	溴化乙啶
EBSS	Earle's balanced salt solution	Earle 氏平衡盐溶液
EDTA·Na <sub>2</sub>	Ethylenediaminetetraacetic acid disodiumsalt	乙二胺四乙酸二钠
EGF	Epidermal growth factor	表皮生长因子
ER $\alpha$	Estrogen receptor alpha	雌激素受体 $\alpha$
ER $\beta$	Estrogen receptor beta	雌激素受体 $\beta$
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
FSH	Follicle-stimulating hormone	促卵泡激素
GAM-B	Goat anti-mouse IgG labeled with biotin	生物素标记的羊抗鼠 IgG
GH	Growth hormone	生长激素
GnRH	Gonadotropin-releasing hormone	促性腺激素释放激素
hCG	Human chorionic gonadotropin	人绒毛膜促性腺激素
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic Acid	N-2-羟乙基哌嗪-N'-乙磺酸
ICSI	Intracytoplasmic sperm injection	胞浆内精子注射
IGF	Insulin-like growth factor	胰岛素样生长因子
IR	Implantation rate	着床率
IVF	In vitro fertilization	体外受精
LH	Luteinizing hormone	促黄体激素
LIF	Leukaemia inhibitory factor	白血病抑制因子
PBS	Phosphatic-buffered saline	磷酸盐缓冲盐溶液
PKA	Protein kinase A	蛋白激酶 A
PMSG	Pregnant mare serum gonadotrophin	孕马血清促性腺激素
PR	Pregnancy rate	妊娠率
SP-HRP	Streptavidin labeled with horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶标记的链酶亲和素
TBS	Tris-buffered saline	Tris 缓冲的盐溶液
TCN	Total cell number	总细胞数
TGF	Transforming growth factor	转化生长因子
UEC	Uterine epithelial cells	子宫上皮细胞

# 目 录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	II
略 缩 表.....	III
目 录.....	IV
第一部分 文献综述.....	1
第一章 胚胎共培养与哺乳动物胚胎发育.....	1
1.1 体外受精后胚胎发育.....	1
1.2 受精卵体内发育环境.....	1
1.3 共培养对体外胚胎发育环境的优化.....	3
1.4 胚胎共培养的作用机制.....	4
1.5 胚的共培养的缺陷.....	5
1.6 展望.....	6
第二章 哺乳动物早期胚胎发育的激素调控.....	7
2.1 促性腺激素释放激素与早期胚胎发育.....	7
2.2 促性腺激素与早期胚胎发育.....	9
2.3 类固醇激素与早期胚胎发育.....	10
2.4 生长激素与早期胚胎发育.....	11
2.5 结束语.....	12
第二部分 研究文.....	13
第三章 小鼠体外受精及胚胎培养.....	13
3.1 材料和方法.....	14
3.2 试验设计.....	18
3.3 实验结果.....	18
3.4 讨 论.....	21
第四章 小鼠子宫内膜上皮细胞与胚胎共培养.....	24
4.1 材料与方法.....	25
4.2 试验设计.....	28
4.3 实验结果.....	29
4.4 讨 论.....	32
第五章 雌激素对早期胚胎发育的影响.....	34
5.1 材料与方法.....	35
5.2 实验结果.....	38
5.3 讨 论.....	42
第六章 结 论.....	44
参考文献.....	45
附 录.....	56
致 谢.....	59

## 第一部分 文献综述

### 第一章 胚胎共培养与哺乳动物胚胎发育

#### 1 体外受精后胚胎发育

体外受精的研究有着漫长的历史。1959年美籍华生物学家张民觉在体外实现了精子和卵子的结合，并将受精卵移植到假孕母体的输卵管内，生出正常的幼兔（Chang, 1959）。1978年世界第一例试管婴儿在英国诞生（陈大元, 2000）。随后很多国家的试管婴儿也相继诞生。在早期，体外受精后的妊娠成功率只有 2.94%（Yovich, 1985）。到目前为止，这项技术虽然在全世界范围内得到广泛的应用，但妊娠成功率徘徊在 20%~40%的水平（Wilson *et al.*, 2004）。这表明这项技术还有待于进一步的改进。

早期的体外受精胚胎移植，多数选择 2 细胞至 8 细胞期的胚胎。后来，人们发现早期胚胎的移植有多胎率高而妊娠率低等一系列问题，而选用囊胚期胚胎进行移植可在很大程度上避免这类问题（Gardner *et al.*, 1998; Patton *et al.*, 1999; Toledo *et al.*, 2000）。目前，国内外的辅助生殖医学中心多采用囊胚期胚胎进行移植。因此，建立更加完善的胚胎体外发育环境，对提高囊胚发育率和胚胎质量非常重要。

哺乳动物早期胚胎在体外发育过程中，主要依靠外源的营养成分（Martin *et al.*, 2000）。因此在胚胎体外培养过程中一个至关重要的因素是培养液的成分。目前有大量的研究表明，对于需要培养到囊胚期的胚胎如果暴露在不适合的培养环境中，这种培养环境将会从很多方面影响胚胎的发育，其中包括对代谢、细胞分化、基因表达以及胚胎移植后的胎儿发育的影响（Lane *et al.*, 1998）。直到目前为止，人类体外受精所用的培养液成分是根据对其它体细胞培养基的成分改进而来的。虽然这些培养液在一定程度上能够支持的早期胚胎发育到囊胚，但是对体外受精后发育到第 5 天的囊胚进行胚胎移植，其着床率却非常的低。有研究表明，约 40%的受精卵能够在添加 10%母体血清 EBSS 液中发育到囊胚期胚胎，但是移植后的妊娠率只有 10%（Bolton *et al.*, 1991）。因此在目前的胚胎体外培养过程中，大量的胚胎不能发育成为具有生殖能力的囊胚，这极大的困扰体外受精技术在辅助生殖医学上的应用。

经过近几十年的研究，人们对胚胎的体外培养体系进行了很大程度的改进，但是仍然不能达到理想的要求。这表明人们对早期胚胎发育过程的认识还有待于进一步的深入，从而不断去完善胚胎的体外培养体系。

#### 2 受精卵体内发育环境



受精卵正常发育是在母体的输卵管和子宫中完成。为了改善胚胎的体外发育环境,人们必须考虑的是胚胎如何在体内完成这一系列发育事件。可以想象的是这些早期事件发生过程中输卵管和子宫不仅仅是运送配子和胚胎的管道,它们一定还具有促进早期胚胎发育的功能。这一假说已被 Bavister 等人的实验证实,即生殖道在早期胚胎发育具有非常重要的作用 (Bavister, 1988)。

## 2.1 母体环境的周期性变化

已有的研究表明,灵长类输卵管的纤毛细胞和分泌细胞随生殖周期而发生周期性变化。这些周期性变化是受到类固醇激素的调控。比如输卵管上皮细胞在外源雌激素的诱导下,输卵管非纤毛的分泌细胞发生增生、成熟 (Comer *et al.*, 1998)。同时子宫也会出现这种形态和生理的周期性变化,这表明输卵管和子宫为着床前的胚胎发育提供了一个动态发育环境。

生长因子及其相应受体在输卵管和子宫以及早期胚胎都有表达。这可能是母体和胚胎间相互作用的一种机制。这些生长因子在母体和胚胎的表达在最近的一些文献中已有大量报道 (Kane *et al.*, 1997; Kaye *et al.*, 1995)。同时大多数生长因子在子宫和输卵管的分泌是周期性的。表皮生长因子 (EGF) 和转化生长因子 (TGF) 以及它们的受体在输卵管和胚胎的研究已有很多。在卵泡后期和黄体期,输卵管和胚胎的 EGF 和 TGF 呈现为高表达,在卵泡前期的表达量却很低 (Morishige *et al.*, 1993; Kurachi *et al.*, 1994)。EGF 和 TGF 的受体在输卵管的表达与其配体相似,在 8 到 16 细胞期的胚胎也有这些受体的表达 (Smotrich *et al.*, 1996)。人的胚胎具有分泌 TGF 的能力,在桑椹胚向囊胚发育过程中胚胎的这种分泌功能会进一步得到加强 (Hemmings *et al.*, 1992)。有研究表明,胚胎体外发育过程中添加这些生长因子可以促进胚胎早期发育,但是仍然不清楚这种作用是通过自分泌或旁分泌途径来完成 (Lighten *et al.*, 1998)。

## 2.2 母体环境与早期胚胎发育

输卵管和子宫为早期胚胎提供适宜的发育环境,这一观点已经得到大家的认可。植入前的胚胎在输卵管和子宫液中完成其早期的发育。因此,研究输卵管和子宫液成分对胚胎发育的影响显得越来越重要。最近,Leese 等对人和灵长类的输卵管液的成分作了大量的研究报道 (Leese, 1998; Menezo *et al.*, 1997)。已有的研究表明,灵长类输卵管液中钾离子和碳酸氢根离子含量要比血浆高 (Lippes *et al.*, 1972; David *et al.*, 1973; Maas *et al.*, 1977)。雌激素可以刺激输卵管液的分泌,因为有证据表明处于生殖周期中期的人和猴子会有一个雌激素峰,而此阶段的输卵管液的量恰好是最多的 (Lippes, 1981)。这表明雌激素对一些离子穿透输卵管上皮细胞的能力具有调节作用,正是通过这种调节来影响输卵管液的分泌 (Leese *et al.*, 2001)。这些实验进一步表明,输卵管对受精和早期胚胎发育具有调节功能。

胚胎在早期发育过程中对营养物质的需求是不断变化的。氨基酸和其他营养物质在早期胚胎发育过程中的重要性已有报道 (Gardner *et al.*, 1998)。人和其他哺乳动物胚胎在早期发育阶段,都需要消耗丙酮酸盐。在致密化的胚胎和囊胚对葡萄糖的需求量也有所增加 (Leese *et al.*, 1993; Leese *et al.*, 1995)。实际上,对人和多种动物的研究表明,高浓度的葡萄糖能够抑制早期胚胎发育 (Conaghan *et al.*, 1993)。输卵管中营养物质的浓度与血浆的浓度存在很大的差别,并且随着机

体内分泌状态的不同而发生一些相应的改变。处于卵泡期的人输卵管液中葡萄糖浓度要比生殖周期的中间阶段低六倍 (Gardner *et al.*, 1996)。由此可以推论, 授精后输卵管液中葡萄糖浓度的下降可能是母体的一种保护反应, 这种保护反应可避免体内的胚胎暴露在高葡萄糖浓度的输卵管液中 (Nichol *et al.*, 1992)。营养物质浓度的重要性在对羊和小鼠胚胎的实验上也得到证实, 基于输卵管液成分的培养液比传统的培养液更加有效的促进胚胎的体外发育 (Tervit *et al.*, 1972; Gardner *et al.*, 1990)。同样, 不同发育阶段的胚胎对氨基酸也有不同的需求, 在培养液中按照输卵管氨基酸浓度的添加氨基酸, 结果囊胚的形成率和孵化率都有显著的提高 (Steeves *et al.*, 1999; Walker *et al.*, 1996)。

除了一般的有机和无机分子外, 输卵管还合成释放一些生物大分子。在生殖周期的中间阶段, 人和多数哺乳动物的输卵管具有合成这些生物大分子的功能 (Buhi *et al.*, 2000)。还有研究表明, 猪和羊的输卵管膨大部合成能力要高于峡部 (Buhi *et al.*, 1991; Buhi *et al.*, 1992)。很多分泌的蛋白, 如输卵管特异糖蛋白 (O'DayBowman *et al.*, 1996)、皮质类固醇结合球状蛋白 (Baltes *et al.*, 1998) 和胰岛素样生长因子结合蛋白 3 (Lai *et al.*, 1996) 等, 可能在受精和早期胚胎发育过程发挥一定的作用。最近有科学家从人输卵管细胞条件培养液中提取出三种高分子量糖蛋白, 同时发现这些高分子量糖蛋白能够促进小鼠胚胎的体外发育 (Liu *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1998)。虽然对其具体的作用还有待于进一步的研究, 但可以确信的是这些分子在母体和胚胎的相互作用方面起到很重要的作用 (Hill, 2001)。

### 3 共培养对体外胚胎发育环境的优化

#### 3.1 体细胞对胚胎体外发育的影响

生殖道微环境可以影响到早期胚胎的发育, 但输卵管和子宫组织中的很多成分来源于血浆, 并不仅仅是由输卵管和子宫组织分泌。然而, 输卵管和子宫细胞对胚胎究竟有何作用? 已有的研究表明, 输卵管和子宫细胞可以提高体外发育的胚胎质量 (Bongso *et al.*, 1992; Yeung *et al.*, 1992; Yeung *et al.*, 1996)。这些研究为证明体细胞直接促进早期胚胎发育提供了有力的证据。到目前为止, 体细胞与胚胎的共培养在人类生殖医学中已经得到应用。

#### 3.2 胚胎共培养技术的应用

近年来, 已有实验室利用体细胞与胚胎共培养来改善配子和胚胎的体外培养条件。而且多种不同的体细胞可以与胚胎进行共培养 (Goto *et al.*, 1992; Ouhibi *et al.*, 1990)。配子和受精卵置于含有一定浓度体细胞条件培养液的体系中, 体外受精率将会有很大提高, 胚胎活力明显增强, 形态结构也有一定改善以及着床率、晚期妊娠率都显著的提高 (Bongso *et al.*, 1989; Vlad *et al.*, 1996)。表 1-1 是采用输卵管细胞与胚胎共培养得到的一些结果 (Yeung *et al.*, 2002)。

现在这项技术在生殖医学上主要用于某些特殊的病症。已有的研究表明, 胚胎共培养对某些病人是非常有效的。比如, 高龄病人、屡次体外受精失败的患者、基础促卵泡激素水平较高的患

者和一些屡次妊娠失败的病人 (Tucker *et al.*, 1994; Wiemer *et al.*, 1996; Wiemer *et al.*, 1994)。对年龄在 35 岁以下且首次进行体外受精的患者来说, 胚胎共培养并没有取得很好的临床效果 (Wiemer *et al.*, 1998)。

表 1-1 采用输卵管细胞共培养的临床试验

Tab.1-1 Clinical trials using oviductal cells

Somatic cell's origin	Patient	Study design	Coculture duration	Cocultured embryo development	Pregnancy/implantation
Bovine	Non-male factors	Prospective randomized	1 day after fertilization	Less fragmentation More blastomeres	Increase PR and IR
	Non-male factors	Prospective randomized	1 day after fertilization	Less negative morphological characteristics	Increase PR
	Young first time IVF; non-male factors	Prospective randomized	2 days after fertilization	More blastomeres Less fragmentation	No difference
	Female > 38 years; multiple failed IVF attempts	Prospective randomized; - assisted hatching	2 days after fertilization	More zona thickness variability	Increase PR
	Multiple failed IVF attempts; non-male factor	Previous IVF as control; - assisted hatching	2 days after fertilization	More blastomeres Less fragmentation	Not compared
	ICSI patients	Prospective randomized	3 days after ICSI	No difference	No difference
Human	Non ICSI	Prospective randomized	1 day after fertilization	Not compared	Increase IR
	Unselected, non-ICSI	Non-randomized	1 day after fertilization	Not compared	Increase PR/IR

ICSI, 胞浆内精子注射; IR, 着床率; IVF, 体外受精; PR, 妊娠率 (引至 Reprod Med Rev., Yeung *et al.*, 2002)

ICSI, intracytoplasmic sperm injection; IR, implantation rate, IVF, in vitro fertilization; PR, pregnancy rate (From Reprod Med Rev., Yeung *et al.*, 2002)

## 4 胚胎共培养的作用机制

目前对于体细胞与胚胎共培养促进早期胚胎发育的机制并不是完全清楚。但是根据已有的研究资料, 可能的作用机制主要有以下几种。

### 4.1 主动调节

主动调节主要指共培养的体细胞可以分泌一些对早期胚胎发育有促进作用的物质。目前研究最多的是生长因子和蛋白分子。在胚胎植入前, 人、小鼠和其它很多动物的胚胎、输卵管和子宫组织可以表达多种生长因子、生长因子受体和一些结合蛋白。许多生长因子, 如IGF、TGF、EGF, 在生殖周期的中期到黄体早期表达量达到最大 (Kurachi *et al.*, 1994; Adachi *et al.*, 1995; Jin *et al.*, 2001; Pfeifer *et al.*, 1994)。而这一时期的胚胎位于输卵管和子宫中。同时许多相应的生长因子受体也在这一时期的胚胎中有表达。因此在胚胎发育早期, 生长因子可以介导母体与胚胎之间的相互作用。生长因子的这种介导作用目前已经通过实验得到进一步的证实, 如添加IGF、LIF的培养液对胚胎的体外发育具有不同程度的促进作用 (Lighten *et al.*, 1998; Dunglison *et al.*, 1993)。除了上述生长因子外, 还有研究对兔输卵管上皮细胞分泌蛋白进行电泳分析, 确定了糖蛋白的分子量

范围介于44~68kD,其中以68kD区带最为明显。由此提示:体外培养的输卵管上皮细胞可分泌糖蛋白。另外,用 $^{125}$ I标记示踪技术对不同发育时期大鼠早期胚胎透明带中分泌性糖蛋白进行分析,结果发现同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,而对照组中没有发现这条特征蛋白区带(Li *et al.*, 1993)。输卵管上皮细胞分泌的糖蛋白不仅对早期胚胎发育有促进作用,而且可以增加输卵管和子宫液的粘度,防止一些重要的营养物质和离子的流失,起到稳定胚胎周围微环境的作用(Hunter *et al.*, 1994)。到目前为止,仍很难用体内实验来验证这些因素对胚胎发育的促进作用。但有资料显示,胚胎共培养可以促进小鼠胚胎某些基因的表达(Lee *et al.*, 2001),同时减少桑椹胚和囊胚期胚胎的细胞凋亡(Xu *et al.*, 2000)。

## 4.2 被动调节

被动调节主要指通过体细胞共培养来消除胚胎体外培养过程中的一些不利的因素,从而促进早期胚胎发育。小鼠早期胚胎与人输卵管细胞进行共培养可使氧自由基浓度明显低于对照组(Joo *et al.*, 2001),由此说明体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,它们可以诱导小鼠胚胎的2细胞阻滞。体细胞与胚胎共培养可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(Gardner *et al.*, 1994)。此外,胚胎共培养体系中的体细胞还具有抗氧化作用。有研究表明体外培养的上皮细胞可以分泌牛磺酸(Ouhibi *et al.*, 1990)。牛磺酸具有抗氧化作用,它可以促进早期胚胎发育(Devreker *et al.*, 1999; Dumoulin *et al.*, 1992)。

## 4.3 细胞与胚胎的接触

胚胎与体细胞共培养可能还通过细胞间的接触来促进胚胎发育。有研究表明,将1细胞小鼠胚胎与人输卵管上皮细胞共培养,如果共培养过程中使胚胎与体细胞不发生接触,则没有一例胚胎发育到囊胚,而在发生接触的共培养体系中有45%的胚胎发育至囊胚阶段(Joo *et al.*, 2001)。这表明,胚胎与体细胞没有接触则共培养不会对胚胎体外发育产生促进作用。相反,用大鼠肝细胞条件培养基对体外受精的牛胚胎进行培养,发育到囊胚期胚胎的比例为56.1%,体细胞共培养体系中囊胚的比例为59.1%,对照组中囊胚的比例为27.1%。说明条件培养基支持牛早期胚胎发育,与胚胎体细胞共培养的效果并没有明显差异(Rehman *et al.*, 1994)。因此目前这种调节方式还存在广泛的争议。

## 5 胚胎共培养的缺陷

体细胞与胚胎共培养系统最初设想是用来的模拟胚胎体内发育环境,但是目前尚未实现这一研究目标。主要原因是体细胞和胚胎对营养成分有不同的需求,这使得共培养体系中的体细胞或胚胎生长在一种不适宜的培养环境中。

为了提高胚胎共培养的效率,优化培养条件显得尤为重要。相关的研究认为在人胚胎的共培养体系中,EBSS培养基对于快速生长期的人输卵管细胞是最为适宜的(Yeung *et al.*, 1992)。也有其他人在牛上得到相似的结论(Wiemer *et al.*, 1998)。他们的研究表明,生长至汇合的细胞单层与没有完全汇合的细胞可能分泌不同水平的促胚胎生长因子,同时类固醇处理会影响到牛输卵管细胞的接种率。完全汇合后会引发上皮细胞的分离和死亡,并导致培养基的酸性增加,对胚胎发育来说是非常不利的。

目前已有许多关于体细胞与胚胎共培养的报道,在这些报道中还采用生殖道以外其它类型的体细胞进行胚胎共培养(Carnegie *et al.*, 1999)。主要是因为这些细胞比输卵管和子宫细胞更容易获取。目前在很多关于人类辅助生殖的报道中,没有采用胚胎共培养仍然有较好的出生率,这表明胚胎共培养能够促进胚胎体外发育,但并不是胚胎发育所必需的。在很多体细胞与胚胎共培养的研究中,这些胚胎仅仅共培养1~2天。这种短期的体细胞与胚胎共培养也可能并不能对胚胎发育有很大作用,妊娠率也没有很大的提高。同时还有研究者采用一些很容易获取的体细胞进行胚胎共培养,如颗粒细胞。由于这些细胞本来的促胚胎发育作用就很小,所以这些研究中采用胚胎与体细胞共培养并没有观察到明显促胚胎生长作用(Fabbri *et al.*, 2000)。

尽管目前很多研究表明采用体细胞与胚胎共培养可以促进胚胎发育,但是作为一项常规的技术来说由于操作较为复杂,所以在目前的人类辅助生殖医学中并没有被广泛的采用。此外,在体细胞与胚胎共培养过程中可能由于某些污染导致胚胎发育异常(Olivennes *et al.*, 1994)。因此更为安全而且便于操作的培养途径还是采用成分简单的化学培养基(Bavister, 1995)。最近一些序贯胚胎培养系统已经引起人们的注意。根据不同发育阶段的胚胎对营养物质的不同需求,这些培养系统对不同阶段的胚胎培养液进行优化。胚胎序贯目前已经成为提高胚胎体外发育的有效途径之一(Gardner *et al.*, 1998)。

## 6 展望

生殖道为哺乳动物早期胚胎提供了一个非常理想的动态发育环境。自然状态下,所有受精后的胚胎暴露在生殖道微环境中。目前的研究表明,生殖道微环境对早期胚胎发育具有很重要的作用,母体和早期胚胎间存在复杂的“对话”。培养效果较好的胚胎培养液也仅含有母体生殖道的部分成分。虽然胚胎在一定程度上能够适应这些体外培养环境(Leese *et al.*, 1995; Lawitts *et al.*, 1991),但是这些不够完善的培养体系将会引起胚胎的应激(Biggers *et al.*, 1998)。这可能是目前在辅助生殖医学中培养效率低下的一个原因。为了改善这些条件,进一步加深对母体内环境的认识是很有必要的。但是,目前关于这方面的认识是非常有限的。体细胞与胚胎共培养尽管有很多的缺陷,但是不可否认的是它还是一种很好的研究模型。这种模型将会为我们认识早期胚胎发育过程中母体和胚胎相互作用提供一些线索。由于胚胎共培养体系中很多成分难以确定,而且很多现象仍不能得到很好的解释,以至于目前共培养技术在临床应用上存在很大争议(Bongso *et al.*, 1993; Bavister, 1992)。通过体细胞与胚胎共培养模型找到那些母体生殖道特异性的因子,并进一步证实它们的胚胎作用将有助于目前争议的消除。相信随着对其影响因素和作用机理更深入系统的研究,胚胎共培养一定会为生殖医学和动物克隆等胚胎生物工程的发展做出重要贡献。

## 第二章 哺乳动物早期胚胎发育的激素调控

哺乳动物的生殖道是一个动态变化的环境，正是在这样一个内环境中机体完成配子的转运、成熟、受精和早期胚胎生长与分化。因此生殖道在生殖过程中具有非常重要的作用。着床前的胚胎一直“沐浴”在一个动态变化的体液环境中。一方面生殖道是很多激素的靶组织 (Comer *et al.*, 1998; Pollow *et al.*, 1982)，机体通过内分泌或旁分泌途径来调节这些靶组织的变化，从而间接调节胚胎发育 (Leese *et al.*, 2001; Kane *et al.*, 1997)。与此同时越来越多的研究表明激素也可能直接来调节胚胎发育 (Francisco *et al.*, 1999; Patsoula *et al.*, 2001; Hou *et al.*, 1996; Pantaleon *et al.*, 1997)。因此激素可能在早期胚胎发育过程中起到重要的作用。目前，内分泌激素对早期胚胎发育调控的研究已经引起人们越来越多的重视。本文对日前研究较多的几种激素进行了简单的回顾。

### 1 促性腺激素释放激素 (GnRH) 与早期胚胎发育

GnRH 是下丘脑分泌的十肽化合物,在哺乳动物生殖活动的神经调控中具有非常重要的作用。下丘脑分泌的 GnRH 经过垂体门脉系统到达垂体部,与垂体前叶中特异的 GnRH 受体结合,从而引发促性腺激素的合成和释放 (Conn *et al.*, 1991)。近期的研究发现,哺乳动物下丘脑以外的其它组织中也有 GnRH 的表达 (Casañ *et al.*, 1998; Chegini *et al.*, 1996; Raga *et al.*, 1998)。同时人们也发现除了垂体有 GnRH 结合位点,胎盘、乳腺、前列腺、卵巢和睾丸这些垂体外器官都有这种 GnRH 的结合位点 (Casañ *et al.*, 1998; Chegini *et al.*, 1996; Raga *et al.*, 1998; Emons *et al.*, 1993)。体内和体外实验表明, GnRH 的激动剂可以直接与这些垂体外 GnRH 受体结合,刺激子宫内层和输卵管产生生理性收缩,同时还可以诱导胎盘组织释放人绒毛膜促性腺激素 (Petraglia *et al.*, 1987; Iwashita *et al.*, 1993)。

正常的植入前胚胎发育和着床要经历一系列复杂的过程。为了完成这一系列的过程,胚胎和母体之间存在相互的调控,这种胚胎和母体的相互调节促使早期胚胎的发育和子宫容受性状态的建立 (Paria *et al.*, 1993)。目前的研究表明 GnRH 在胚胎和母体之间的相互调控过程中具有很重要的作用 (Francisco *et al.*, 1999)。

为了进一步认识 GnRH 在胚胎和母体相互调控过程中的作用, Seshagiri 等人 1994 年首先从恒河猴的孵化前胚泡和孵化胚泡的培养液中发现了胚胎所分泌的 GnRH,然而在孵化失败的胚泡培养液中却没有发现这种 GnRH。随后他们小组采用 GnRH 的单克隆抗体对胚胎进行免疫染色,结果表明孵化前胚胎的内细胞团和滋养层细胞均有这种 GnRH 阳性细胞 (Seshagiri *et al.*, 1994)。1999 年 Raga 研究小组在对小鼠的研究中发现,桑椹胚开始就有 GnRH 和 GnRH 受体 mRNA 的表达。GnRH 蛋白从桑椹胚开始也有表达,囊胚期胚胎 GnRH 的表达量增加,而且胚胎的滋养层

和内细胞团细胞同时存在 GnRH 蛋白表达 (Francisco *et al.*, 1999)。随后该小组在人的胚胎上发现 GnRH 和 GnRH 受体的表达也有同样的规律 (Casan *et al.*, 1999)。此外他们在小鼠的早期胚胎培养液中添加一定剂量的 GnRH 激动剂, 结果囊胚的孵化率有了明显提高, 而且这种激动剂对早期胚胎发育的影响在添加 GnRH 拮抗剂后被消除。如果再加入 GnRH 激动剂, 这种拮抗作用会被消除。这表明 GnRH 对早期胚胎发育的作用是特异性的, 而不是非特异性的或毒副作用所至 (Francisco *et al.*, 1999)。

哺乳动物妊娠的建立还需要孕体所分泌一些特异性蛋白。这些蛋白可以直接或间接的作用于黄体来维持孕酮的分泌, 从而确保适宜的子宫内环境来维持孕体的发育 (Petraglia *et al.*, 1995)。有研究表明, 植入期胚胎和胎盘合成和分泌人绒毛膜性腺激素 (hCG) 主要是受滋养层细胞分泌的 GnRH 调控 (Seshagiri *et al.*, 1994)。Summer 的研究还进一步发现内细胞团可以诱导滋养层细胞合成和释放 hCG, 这一方面表明内细胞团和滋养层细胞的紧密的空间关系可以引发 hCG 的合成 (Summers *et al.*, 1993)。但是 Seshagiri 等人关于 GnRH 的分泌可以促进植入期胚胎 hCG 的证据表明, 内细胞团和滋养层细胞的 GnRH 可以诱导胚胎 hCG 的分泌 (Seshagiri *et al.*, 1994)。这一结论将进一步说明 GnRH 不仅可以调控胎盘 hCG 的合成和释放, 而且可以调节植入期胚胎合成和释放 hCG。

大量研究表明 GnRH 通过自分泌途径来调控早期胚胎的发育, 但是早期胚胎就存在 GnRH 受体的表达, 这也意味着 GnRH 也可能通过旁分泌途径来影响早期胚胎的发育。同时 GnRH mRNA 和蛋白在孵化胚胎的表达量要高于桑葚胚的表达量, 这表明 GnRH 可能在胚胎着床中具有重要的作用 (Casañ *et al.*, 1998; Raga *et al.*, 1998)。另一方面在桑葚胚发育到囊胚这一阶段 GnRH 受体的表达量始终维持在一个恒定的水平, 这也提示胚胎与母体的相互调节可能是通过 GnRH 来介导的 (Hearn *et al.*, 1988)。

1998 年 Raga 研究小组还对人子宫内膜的 GnRH 及其受体的表达情况进行系统研究, 结果表明具有生殖能力的妇女, 在整个月经周期内子宫内膜上皮和基质细胞都有 GnRH mRNA 表达。同时增殖期子宫基质细胞中 GnRH mRNA 表达比上皮细胞表达量更大, 然而黄体期上皮细胞的 GnRH mRNA 表达量会有所加强。免疫组织化学研究的发现体期和分泌期的子宫基质、腔上皮和腺上皮细胞中都有 GnRH 的表达, 而且他们的表达量在黄体期会增加。采用巢式反转录聚合酶链反应在卵泡期和黄体期的人子宫内膜组织中发现 GnRH 受体的表达, 虽然表达量较低但这表明在正常的子宫内膜组织就有 GnRH 的表达 (Raga *et al.*, 1998)。

在早期的报道中就有人指出, GnRH 及其激动剂可以促进小鼠、牛和人的体外受精 (Morales, 1998; Funston *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1995), 而且可以促进早期胚胎的卵裂 (Funston *et al.*, 1995)。因此该小组又对输卵管 GnRH 的表达进行研究, 发现黄体期的输卵管就有 GnRH mRNA 和蛋白表达, 但是他们在卵泡期和绝经后的输卵管组织中却没有发现这种 GnRH 的表达 (Casan *et al.*, 2000)。这表明 GnRH 在输卵管的表达是一种动态模式。

目前的研究都表明, GnRH 可以通过自分泌途径来调节胚胎的发育, 同时子宫和输卵管的 GnRH 可以通过旁分泌途径来进一步调节早期胚胎的发育。这也与植入前早期胚胎可以在体外完成早期发育, 但是在添加母体生殖道分泌物可以进一步促进早期胚胎发育和着床这一实验结论相一致。

## 2 促性腺激素与早期胚胎发育

垂体前叶释放的促黄体激素 (LH) 和促卵泡激素 (FSH) 是两种结构上相关的糖蛋白, 它们是正常的性腺发育和功能所必需 (Gharib *et al.*, 1990)。LH 和 FSH 在靶细胞上的生物学功能是由相应的促黄体激素受体和促卵泡激素受体介导, 并通过细胞内 cAMP 信号通路来完成 (Segaloff *et al.*, 1993)。

哺乳动物胚胎在体外发育过程中普遍存在发育阻滞现象。已有的研究表明, 核苷类物质会造成胚胎的体外发育阻滞, 如次黄嘌呤 (Loutradis *et al.*, 1987)。到目前为止, 次黄嘌呤所引起的小鼠早期胚胎体外发育阻滞的机制仍然还不是很清楚, 但有一点可以确定, 这种阻滞作用并不是通过对转录或翻译的阻断所引起 (Fissore *et al.*, 1992)。次黄嘌呤可以抑止小鼠卵母细胞减数分裂的恢复, 这种抑止作用主要是通过它对磷酸二酯酶的抑止, 继而引起cAMP浓度的升高 (Eppig *et al.*, 1985)。然而, 次黄嘌呤所引起的胚胎体外发育阻滞并不是通过对磷酸二酯酶的抑制的所造成 (Nurreddin *et al.*, 1990)。次黄嘌呤所引起的胚胎体外发育阻滞可以被一些能够增加细胞内cAMP的物质所消除 (Nurreddin *et al.*, 1990; Fissore *et al.*, 1992)。很有趣的是LH和FSH同时添加可以消除这种阻滞, 而单独添加FSH对阻滞没有明显的改善。hCG和LH具有相同的生物功能, 单独添加hCG却可以改善胚胎的体外发育阻滞, 并对早期的胚胎发育有一定的促进作用。近期的研究表明, LH和FSH的受体在小鼠卵母细胞、受精卵以及2细胞、4细胞、桑椹期和囊胚期的胚胎都有表达 (Patsoula *et al.*, 2001)。这提示我们, 可能存在一种新的机制去解释促性腺激素如何直接调控卵母细胞的成熟。LH和FSH可能直接作用于早期胚胎, 引起cAMP浓度的升高, 从而降低小鼠胚胎体外发育的2细胞阻滞。

虽然培养液中添加hCG对胚胎发育没有明显影响, 但是在输卵管上皮细胞与胚胎共培养体系中, 添加hCG会对胚胎的发育产生一定的促进作用 (Mishra *et al.*, 2003)。这种作用可能是由于hCG和促进胚胎发育的因子之间存在相互协同的结果, 因为已有的研究表明胚胎自身可以分泌一些促胚胎生长因子, 而且体细胞与胚胎共培养体系中体细胞也可以分泌一些促进胚胎发育的因子。此外还发现如果阻断上皮细胞的LH受体的合成途径, 添加hCG后输卵管上皮细胞中输卵管糖蛋白的表达量明显降低, hCG的添加对胚胎体外发育不会产生明显的促进作用。这表明在体细胞与胚胎共培养体系中添加hCG会引起上皮细胞分泌输卵管糖蛋白, 这种糖蛋白在胚胎的发育过程中具有很重要的作用。这一研究也表明, hCG促进上皮细胞分泌这种糖蛋白的作用是通过上皮细胞的LH受体介导完成。LH和hCG促进输卵管糖蛋白分泌是通过cAMP/PKA的信号通路完成的 (Wang *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 1997)。因为选用特异性抑制PKA的抑制剂H-89可以阻断hCG对输卵管糖蛋白分泌的调节, 而采用PKC的抑制剂Bis却不能。因此不能断言只有输卵管糖蛋白而排除其它因子的作用, 但是可以肯定的是输卵管糖蛋白在这个过程中起到关键性的作用。

到目前为止, 已经发现LH和FSH受体在早期胚胎就开始表达, 但这些促性腺激素受体在早期胚胎发育过程中究竟有什么作用仍然不清楚。



### 3 类固醇激素与早期胚胎发育

雌激素和孕酮在哺乳动物妊娠的建立和维持当中起很重要的作用。妊娠动物如果缺少这些激素,将会影响到胚胎的正常发育和妊娠。有实验表明,妊娠大鼠垂体摘除后则会表现为胚胎进入子宫的延迟、胚胎在子宫受到排斥和发育受阻,但是注入雌激素和孕酮后则会明显改善这种对胚胎的不利影响(Wu *et al.*, 1971)。卵巢摘除后的小鼠注射孕酮后则会表现为延迟着床,但是这些处于休眠状态的囊胚在体内注入雌激素后又可以恢复着床(Yoshinaga *et al.*, 1966; Nieder *et al.*, 1987)。在早期研究中,人们将妊娠动物卵巢摘除后注入外源激素,发现雌激素和孕酮对早期胚胎发育和妊娠过程中所起的重要作用。这些激素究竟是直接作用于胚胎,还是通过母体生殖道间接作用于胚胎并不清楚。

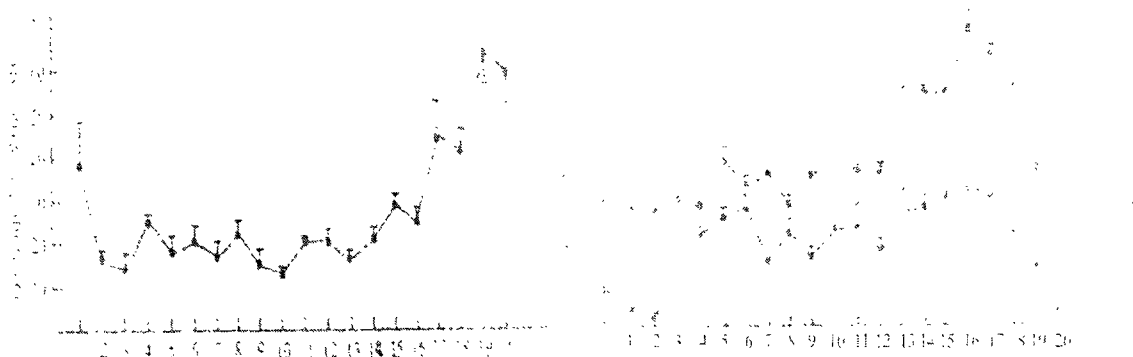


图 2-1 妊娠小鼠外周血清雌激素和孕激素水平的变化 (源于 J.Endocr., McCormack, 1974)

Fig.2-1 Peripheral plasma progesterone and oestradiol-17 $\beta$  concentrations during pregnancy in the mouse (From J.Endocr., McCormack, 1974)

母体生殖道细胞增殖和分泌功能是受到卵巢类固醇激素的调控(Martin *et al.*, 1968)。妊娠大鼠注入抗孕酮的抗体将会阻滞胚胎发育(Rider *et al.*, 1987)。同样给妊娠小鼠注入抗孕激素药物 RU486,也得到相似的结果(McRae *et al.*, 1994)。此外, RU486 还会影响到小鼠输卵管对胚胎的转运(Yang *et al.*, 1990)。除了孕酮外,传统的观念认为雌激素通过输卵管来间接影响胚胎发育。因为雌激素可以诱导输卵管 IGF-1 和 EGF 受体的 mRNA 的表达(Carlsson *et al.*, 1993; Adachi *et al.*, 1995)。但是这些激素也有可能直接作用于胚胎。为了验证这种推测,通过对胚胎的体外培养,发现雌激素可以影响胚胎对核苷酸前体和氨基酸的摄取(Harrer *et al.*, 1973; Smith *et al.*, 1971)。抗雌激素药物 CI628 和芳香化酶抑制剂均能抑制小鼠胚胎的发育,这种对胚胎发育的抑制作用在注入雌激素后减弱(Sengupta *et al.*, 1982)。

雌激素和孕酮可以与其核受体发生特异性结合,这些受体由于激素的结合而被激活,激活的受体又可以作为转录调控因子来调节靶基因的转录表达。如果雌激素和孕酮可以直接作用于胚胎,那么在胚胎时期一定存在雌激素和孕激素受体。

Wu 等人在 1992 年首次用反转录聚合酶链式反应的方法检测出雌激素受体 mRNA 存在于小鼠的卵母细胞和 2 细胞的胚胎(Wu *et al.*, 1992)。Hou 等人采用巢式反转录聚合酶连反应,发现雌激素受体的 mRNA 不仅存在于小鼠卵母细胞、受精卵和 2 细胞胚胎,而且还发现雌激素受体

mRNA 从 2 细胞时期开始下降, 在 5 细胞到 8 细胞时期表达量达到最低。桑椹胚时期没有表达, 但是在囊胚期又会重新有 mRNA 的表达。孕激素受体的 mRNA 在囊胚期胚胎同样有表达, 但是在囊胚期以前却一直没有表达 (Hou *et al.*, 1993)。

虽然人们已经从 mRNA 水平上证明了雌激素和孕激素受体存在于植入前小鼠的胚胎, 但是并不能由此就认为雌激素和孕激素是直接作用于小鼠胚胎。因为雌激素和孕激素发挥其功能主要是通过其受体蛋白, 因此雌激素和孕激素直接作用于胚胎必然要求在胚胎上有相应的受体蛋白的表达。雌激素受体的 mRNA 在早期胚胎的出现仅仅意味着雌激素受体基因被转录, 并不能确保雌激素受体蛋白的表达。

Hou 等人在 1996 年用免疫细胞化学的方法, 首次发现了雌激素受体蛋白在囊胚期的小鼠胚胎有表达, 同时还发现雌激素受体蛋白在囊胚的滋养成细胞和内细胞团细胞都有表达 (Hou *et al.*, 1996)。Ying 等人在 2000 年用反转录聚合酶连反应在猪的 1 细胞、2 细胞和 4 细胞期的胚胎都发现有雌激素受体的 mRNA 的表达, 从 5 细胞到桑椹胚没有表达, 但是在囊胚期又会有表达。同时用免疫细胞化学方法检测到 1 细胞和 4 细胞有雌激素受体蛋白的表达, 而其它时期却没有检测到 (Ying *et al.*, 2000)。

从 96 年开始人们分别从大鼠、人和小鼠中分离出另一种雌激素受体  $\beta$ , 它与  $\alpha$  有高度的同源序列, 并与雌激素发生特异结合 (George *et al.*, 1996)。与激素结合后的雌激素受体  $\beta$  具有与  $\alpha$  相似的转录激活途径 (Paul *et al.*, 1997), 但是雌激素受体  $\beta$  的转录激活功能又与雌激素受体  $\alpha$  不同 (Paech *et al.*, 1997), 因此在早期的胚胎发育过程中它们的表达和分布情况可能也存在一定的差异。Hiroi 等人在 1999 年发现雌激素受体  $\alpha$  mRNA 在小鼠卵巢、卵丘卵母细胞复合体、裸卵、2 细胞和 4 细胞期的胚胎都有表达, 8 细胞虽然没有表达, 但是在桑椹胚和囊胚都有表达。雌激素受体  $\beta$  mRNA 的表达除了在桑椹胚没有发现外, 其它与雌激素受体  $\alpha$  的表达情况一样。另外为了验证在早期胚胎中存在的雌激素受体蛋白是否介导了雌激素的作用, 他们检测了一个雌激素应答基因 *efp* 的表达, 结果发现在卵巢、卵丘卵母细胞复合体、4 细胞、桑椹胚和囊胚期的小鼠胚胎都有 *efp* 的 mRNA 表达 (Hiroi *et al.*, 1999)。这表明胚胎本身的雌激素受体在早期胚胎发育过程中具有重要作用。

## 4 生长激素 (GH) 与早期胚胎发育

垂体分泌的 GH 可以调节机体的生长发育, 但是这种激素在早期胚胎发育过程中的作用目前还存在很大争议。对多种妊娠动物进行垂体摘除, 结果子宫内的胎儿仍然能够正常发育 (Gluckman *et al.*, 1981), 所以目前大多人的观点是 GH 对早期胚胎发育没有显著影响。

越来越多的研究表明, GH 和 GH 受体可能在早期胚胎发育过程具有重要作用。植入前不同时期的小鼠早期都有 GH 受体的转录, 但是 2 细胞期的胚胎才开始有 GH 受体蛋白的表达 (Pantaleon *et al.*, 1997)。然而在牛上的研究却表明, 第 2 天胚胎开始有 GH 受体的转录 (Terada *et al.*, 1996)。对其表达进行定量研究, 发现在第 2 天到第 6 天的胚胎形成过程中 GH 受体 mRNA 的表达量增加, 第 6 天的胚胎 GH 受体 mRNA 的转录水平达到最大值, 第 8 天的胚胎 GH 受体 mRNA 的水平却与第 2 天胚胎的转录水平相当。GH 受体蛋白可以在第 3 天的牛的胚胎细胞质中检测到, 桑椹胚和囊胚期胚胎

细胞的细胞质和细胞核中都有表达 (Sabine *et al.*, 2001)。而GH受体蛋白主要在卵裂期小鼠胚胎细胞核中表达,可是在囊胚期胚胎细胞的细胞质和细胞膜上都有表达 (Pantaleon *et al.*, 1997)。细胞核中GH受体蛋白的功能到目前为止还不清楚,但是通过不同的方法已经证明好几种细胞的细胞核中都存在GH受体的表达 (Lobie *et al.*, 1994)。

此外还发现,第4天的小鼠胚胎就有GH的mRNA和蛋白 (Pantaleon *et al.*, 1997),牛的早期胚胎发育到第8天虽然就有GH的mRNA表达,但是在第8天和第10天的早期胚胎采用免疫细胞化学方法却没有检测到GH蛋白的表达 (Sabine *et al.*, 2001)。GH在早期胚胎的转录意味着, GH对早期胚胎的作用是通过母体分泌的GH,后期则可能是通过自分泌或旁分泌途径。

在成年动物的体内, GH可以促进机体的生长发育,对蛋白、糖以及脂类的代谢具有重要的调控功能。GH的作用可以划分为两类,一类是短期的胰岛素样作用,它可以促进糖的吸收利用和抗脂解作用。另一类是长期的类似胰岛素拮抗剂的作用,可以降低糖的吸收利用和促进脂解作用 (Davidson, 1987)。但是GH在早期胚胎发育过程中对代谢的作用目前还不清楚。近期的研究表明,体外培养液中添加GH可以促进猪囊胚期胚胎的扩张,同时对囊胚期胚胎细胞的凋亡也会造成一定的影响 (Kidson *et al.*, 2004)。GH在牛的早期胚胎发育过程中对糖的代谢有明显的调节作用。常规的体外培养环境中第3天以后的早期胚胎会有过多的糖原的聚集。如果在胚胎体外过程中添加GH,则会发现细胞质和细胞间隙储存的糖原减少。通过进一步的研究,他们还发现体外环境下糖原是内细胞团含量最为丰富的糖类物质。分别将第2、3和5天的胚胎分别用GH处理,发现糖原的分布和量均没有显著变化。但是第6天的囊胚培养到第8天的过程中添加GH,则会发现糖原的储存明显减少,这表明第6天以后胚胎的GH受体才会发挥相应功能 (Kolle *et al.*, 2004)。降低胚胎细胞中糖原的含量可能是通过以下几种途径完成: 1) 破坏糖的转运; 2) 抑制糖原的合成; 3) 促进糖原的降解 (Sabine *et al.*, 2001)。小鼠囊胚用GH处理,则糖的转运能力会明显加强 (Pantaleon *et al.*, 1997)。这进一步说明,糖原减少可能是通过降低糖原的合成,或者激活了糖原的降解途径。葡萄糖是桑葚胚以后的胚胎发育过程中很重要的能量物质,因此体外条件下GH对早期胚胎发育的促进作用在一定程度上是通过对糖原吸收和利用影响,从而获得更多的葡萄糖来完成。

## 5 结束语

哺乳动物胚胎发育是一个很复杂的过程。在这个复杂的过程中,发育环境中的很多激素可能会对胚胎的生长发育产生一定的调控作用。这些激素可以通过多种途径来调节早期胚胎发育。随着胚胎相关技术的快速发展,人们逐渐认识到胚胎发育环境的重要性。激素是机体内环境的重要调节因素之一,但是目前激素对早期胚胎发育的研究却相对较少。因而对相关的认识也非常的有限,这严重制约了胚胎相关技术的发展。相信随着今后研究的不断深入,人们将会对哺乳动物早期胚胎发育的内分泌环境与早期胚胎发育有更深入的了解。这不仅可以加深人类对胚胎早期发育事件的认识,而且通过相关研究可以进一步完善体外培养体系,为临床应用和动物生产带来一定的经济效益。

## 第二部分 研究论文

### 第三章 小鼠体外受精及胚胎培养

**摘要:**本实验旨在建立稳定、高效的昆明小鼠胚胎体外培养和体外受精体系。实验一将超排获取的小鼠合子,分别用 mKSOM 和 CZB 培养液进行体外培养,比较了两种不同培养体系对小鼠早期胚胎发育的影响。结果表明, mKSOM 和 CZB 培养液都可以得到较高的囊胚发育率 (B6D2F1 鼠为 73.6%和 67.6%, KM 鼠为 76.7%和 60.3%), 囊胚总细胞数没有显著差异 ( $P>0.05$ ); B6D2F1 (C57BL/6 × DBA/2) 和 KM 小鼠的精子对胚胎的卵裂率和囊胚总细胞数没有显著影响 ( $P>0.05$ )。实验二将体内成熟的小鼠卵母细胞,分别采用 B6D2F1 和 KM 小鼠的精子进行体外受精,受精卵在 mKSOM 培养液中进行培养,比较这两种品系小鼠精子对体外受精的影响。结果表明, B6D2F1 小鼠精子的受精率、囊胚率和囊胚总细胞数显著高于 KM 小鼠的精子 ( $P<0.05$ )。上述结果表明, mKSOM 培养液能够很好支持昆明小鼠胚胎体外发育;采用 B6D2F1 小鼠的精子进行体外受精,其受精率、囊胚率和囊胚总细胞数显著高于 KM 小鼠的精子。

**关键词:** 昆明小鼠, 体外受精, 体外培养

小鼠体外受精已经是一项较为成熟的技术,广泛应用于哺乳动物受精机理的研究。小鼠作为一种最常用的实验动物,仍然是人们研究中首选的一种动物模型。昆明小鼠是由我国自行繁育的一个小鼠品系,被国内很多实验室采用。

小鼠早期胚胎体外培养体系中, CZB 培养液采用乳酸盐和丙酮酸盐替代了葡萄糖作为能量物质,成功克服一些小鼠品系中存在的 2 细胞阻滞,如 CF1 (Chatot *et al.*, 1990)。同时也能很好支持昆明小鼠胚胎体外发育,在小鼠胚胎体外培养和胚胎操作过程中被广泛应用 (Brison *et al.*, 1991; Eggan *et al.*, 2001)。这种培养体系的缺陷是在早期胚胎培养过程中需要进行换液。KSOM 也是一种较好的培养液,这种培养液可以支持很多品系小鼠胚胎体外发育 (Lawitts and Biggers, 1991)。升高 KSOM 培养液中葡萄糖和蛋白的浓度 (mKSOM) 不仅可以很好的支持早期胚胎发育,而且还可以在这种体系中完成体外受精过程 (Summers *et al.*, 1995; Summers *et al.*, 2000)。但是到目前为止还没有人在昆明小鼠上应用用这种培养体系。综合已有的研究结果,不同精子和培养液可能会对体外受精效率产生一定的影响 (尹海林等, 1989; 张嘉保等, 2001; 王敏康等, 2000; 乌日琴等, 2001; 汪凡等, 2002)。而近期研究结果表明,精子携带的遗传信息对哺乳动物

的体外受精和早期胚胎体外发育也会产生一定的影响 (Comizzoli *et al.*, 2000; Ward *et al.*, 2001; Denny *et al.*, 2004)。

本研究旨在比较 CZB 和 mKSOM 培养液对小鼠胚胎体外培养的效果, 并研究了不同品系小鼠精子对体外受精效率的影响, 以建立稳定、高效的昆明小鼠胚胎的体外培养和体外受精体系。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物与试剂

#### 1.1.1 实验动物

4~6 周龄的雌性、10 周龄的雄性昆明小鼠购于中国科学院遗传与发育所实验动物中心, 10 周龄的雄性 B6D2F1 (C57BL/6 × DAB/2) 小鼠由中国农业大学农业生物技术国家重点实验室赠送。

#### 1.1.2 试剂

所用试剂分别购至如下公司: 孕马血清促性腺激素 (PMSG) 和人绒毛膜促性腺激素 (hCG) 购自宁波市激素制品有限公司; 丙酮酸钠、60% 乳酸钠、葡萄糖、HEPES、NaCl、KCl、NaHCO<sub>3</sub>、EDTA·Na<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O、MgSO<sub>4</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、牛血清白蛋白 (BSA)、石蜡油、透明质酸酶、Hoechst33342 均为美国 Sigma 公司生产 (St Louis, MO, USA); 青霉素、链霉素购至华北制药厂。

#### 1.1.3 仪器设备

普通冰箱、CO<sub>2</sub> 培养箱 (Sanyo)、Milli-Q 超纯水仪装置、解剖显微镜 (Motic)、荧光显微镜 (Leica)、倒置显微镜 (Leica)、电子天平 (Yamatoz)、数码相机 (Canon)、超净工作台、PHS-3C 型精密 pH 计、KQ-500 型超声波清洗器、全自动压力蒸汽消毒锅、恒温台、BJ-40 玻璃管。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 溶液的配制

- 1) CZB、mKSOM、mFHM、HTF 参考相关文献进行配制 (Chatot *et al.*, 1989; Summers *et al.*, 1995; Summers *et al.*, 2000; Hofker *et al.*, 2002), 配制方法见附录。
- 2) PMSG 的配制: 将 PMSG 针剂 (1000IU) 溶于 20ml、0.9% 的生理盐水, 充分融解后分装于 Eppendorf 管中, -20℃ 保存备用。
- 3) hCG 的配制: 将 hCG 针剂 (1000IU) 溶于 20ml、0.9% 的生理盐水, 充分融解后分装于

Eppendorf 管中, -20℃保存备用。

- 4) 300IU 的透明质酸酶: 1ml 的 mFHM 液中加入 50mg 透明质酸酶, 溶解后 0.22 $\mu$ m 的滤膜过滤除菌, 分装于 Eppendorf 管中, -20℃保存备用。
- 5) Hoechst33342 染色液: a) Hoechst33342 储存液的配置: 取 0.045g 的 Hoechst33342 溶于 10ml 的 DMSO, 分装后 4℃储存;  
b) 工作液的配置: 2.5ml 的甘油、15 $\mu$ l 的 Hoechst33342 储存液、7.5ml 的 PBS, 过滤分装, 4℃储存。

### 1.2.2 捡卵针的制备

外径为 2.5mm 的玻璃针管在酒精灯加热融化后, 拉制成 100~200 $\mu$ m 的细管。在内径为 120~180 $\mu$ m 处用医用小砂轮划断针管。断口在酒精灯外焰稍微融口, 置于针盒中备用。

### 1.2.2 动物饲养

动物房内设置光周期 8:00~20:00, 暗周期 20:00~8:00。饲养温度为 20~25℃。自由采食与饮水。

### 1.2.3 雌鼠发情周期鉴定

直接观察	1) 发情前期	阴道口褶皱轻微红肿、紧闭、洁净, 阴道内壁为粉红色, 湿润;
	2) 发情期	阴道口褶皱明显红肿、微张、洁净, 阴道内壁粉红色, 干燥;
	3) 发情后期	阴道口褶皱红肿、由松弛张开到紧闭, 有大量分泌物, 阴道内壁粉红色, 有液体;
	4) 发情间期	阴道口紧闭, 阴道内壁粉红色, 潮湿。
涂片观察	1) 发情前期	主要为有核上皮细胞, 少量角质化上皮细胞;
	2) 发情期	主要为角质化上皮细胞, 少量有核上皮细胞;
	3) 发情后期	仅有散在或积聚的角化上皮细胞、有核上皮细胞, 并开始有白细胞;
	4) 发情间期	主要为白细胞, 少量角化上皮细胞、有核上皮细胞。

### 1.2.4 雌鼠超数排卵

选择发情间期的昆明雌鼠腹腔注射 PMSG, 5IU/只; 46h 后再按照 5IU/只的剂量腹腔注射 hCG。

### 1.2.5 受精卵的采集

超排雌鼠在注射 hCG 后与雄性昆明小鼠或 B6D2F1 小鼠合笼 (雌鼠:雄鼠=1:1)。次日上午 8:00 检查阴栓, 有阴栓者判定为合笼成功。在注射 hCG 后 20~22h 用引颈脱臼法处死供体鼠, 并以 70% 的酒精喷洒小鼠全身以消毒并防止毛发飞扬。将小鼠背面朝上平放于吸水纸上, 在背部正 7 上方靠近最后一根肋骨位置将皮肤横向剪开一小口。一只手抓住切开皮肤的近尾部, 另

一只手抓住近头部牵拉直至充分暴露背部两侧。在肋骨两侧两团明显的脂肪块的位置开一小口，即暴露出白色的脂肪，用眼科镊夹住脂肪，并将其拉出体外，此时可见子宫、卵巢和输卵管。用镊子先夹住子宫，首先在输卵管和卵巢连接处剪断，然后在输卵管和子宫结合处剪断。将输卵管转移到盛有 mFHM 的培养皿，置于 37℃ 加热台保温。

将平皿置于解剖显微镜镜台上，在 25 倍镜下找到输卵管的膨大部。用钟表镊撕开膨大部，释放出受精卵和卵丘细胞的复合物。然后用捡卵针将复合物移入透明质酸酶液滴中处理 3min，并轻轻吹打以助消化。待复合物由团块状分散成单个细胞后，检出裸卵随即将其转入 mFHM 液滴内，用 mFHM 洗 3~5 次后，将卵转入胚胎培养液，在 37℃、95%湿度、5%CO<sub>2</sub> 培养箱内培养。

### 1.2.6 小鼠体外受精

#### 1) 小鼠的准备

10 周龄的 KM 和 B6D2F1 种小鼠，每只种小鼠每隔 3~4 天交配一次。选取具有生殖能力的种小鼠，在处死取精子前三天停止进行交配。

#### 2) 精子的准备

在雌鼠注射 hCG 后 12h，颈部脱臼处死供精的小鼠，并以 70% 的酒精喷洒小鼠全身以消毒并防止毛发飞扬。将小鼠腹面朝上平放于吸水纸上，在腹部靠近尾部中央位置开一小口。用双手从开口处拉开皮肤直至完全暴露腹腔。切开腹膜，找到睾丸和附睾。用眼科剪分离掉附睾尾部的脂肪组织，然后取出附睾的尾部。将附睾尾转移到盛有 mFHM 的培养皿中，置于 37℃ 加热台保温。

组织块移入已平衡过夜的 2ml 的 HTF 中，在 6 倍镜下将附睾尾部剪开数个小口。然后将盛有附睾尾的培养皿放入培养箱中。20min 后取出培养皿，在 6 倍的解剖镜下用钟表镊取出附睾组织块。将培养皿继续放入培养箱中，37℃、95%湿度、5%CO<sub>2</sub> 条件下精子继续获能 90min。

#### 3) 卵母细胞的收集

在注射 hCG 后 13~14h 用引颈脱臼法处死供体鼠，并以 70% 的酒精喷洒小鼠全身以消毒并防止毛发飞扬。将小鼠背面朝上平放于吸水纸上，在背部正上方靠近最后一根肋骨位置将皮肤横向剪开一小口。一只手抓住切开皮肤的近尾部，另一只手抓住近头部牵拉直至充分暴露背部两侧。在肋骨两侧两团明显的脂肪块的位置开一小口，即暴露出白色的脂肪，用眼科镊夹住脂肪，并将其拉出体外，此时可见子宫、卵巢和输卵管。用镊子先夹住子宫，首先在输卵管和卵巢连接处剪断，然后在输卵管和子宫结合处剪断。将输卵管转移到盛有 mFHM 的培养皿，置于 37℃ 加热台保温。

将平皿置于解剖显微镜镜台上，在 25 倍镜下找到输卵管的膨大部。用钟表镊撕开膨大部，释放出卵丘卵母细胞的复合物。复合物在 mFHM 中清洗 3 遍后，将卵丘卵母细胞复合物移入已平衡过夜的 0.5ml 受精液中等待获能的精子。

#### 4) 体外受精

获能结束后,将精子加入已经含有卵丘卵母细胞复合物的受精液滴。并最终使受精液中精子的密度为  $0.5\sim 1\times 10^6/\text{ml}$ ,在  $37^\circ\text{C}$ 、95%湿度、5% $\text{CO}_2$  条件下受精 5~6h。

#### 5) 受精率的检测

受精结束后,用捡卵针将卵母细胞移入预热的 mFHM 液滴中,并轻轻吹打以洗掉透明带上黏附的精子。反复洗 3~5 次后,将卵移入培养液滴,  $37^\circ\text{C}$ 、95%湿度、5% $\text{CO}_2$  培养箱内培养。体外培养 24h 后,取出培养皿在倒置显微镜下观察,将均等分裂为 2 细胞者判定为受精卵,并记录拍照。

#### 1.2.7 早期胚胎培养

在进行早期培养的前一天晚上,将培养液在 35cm 的培养皿上做成 30ul 的小滴,用石蜡油覆盖,放入培养箱中,  $37^\circ\text{C}$ 、95%湿度、5% $\text{CO}_2$  预平衡过夜。早期培养时,首先用 3 个预平衡的培养液滴清洗受精卵 3 遍,然后将受精卵移入剩余的液滴,每个液滴放 10 个受精卵,将培养皿放入培养箱,  $37^\circ\text{C}$ 、95%湿度、5% $\text{CO}_2$  开始进行培养。分别在培养 24h、48h、72h 和 96h 后观察记录胚胎的发育情况。

#### 1.2.8 体内囊胚的收集

超排雌性小鼠在注射 hCG 后与雄性 KM 或 B6D2F1 小鼠合笼。次日早上 8:00 检查阴栓,见栓当天记为第一天 (D1)。有阴栓的小鼠于 D4 天上午 8 点颈椎脱臼处死,以 70%的酒精喷洒小鼠全身以消毒并防止毛发飞扬。将小鼠腹面朝上平放于吸水纸上,在腹部靠近尾部中央位置开以小口。用双手从开口处拉开皮肤直至完全暴露腹腔。将内脏向上翻,即暴露出两侧的子宫。分离掉子宫系膜及附着物,取下子宫置于 mFHM 液中,洗去血液。然后将子宫组织放入一平皿中,用眼科剪在子宫角末端作“十”字形切口。1ml 无菌注射器吸预热的 0.5~0.6ml mFHM 液从子宫颈处扎入针头并插入一侧子宫角,以此反复冲洗子宫 3 次。然后将针头插入另一侧子宫角,重复以上操作。在 25 倍解剖镜下收集形态良好的囊胚,移入预先平衡好的覆盖有石蜡油的 mKSOM 液中,置于  $37^\circ\text{C}$ 、95%湿度、5% $\text{CO}_2$  的培养箱中备用。

#### 1.2.9 囊胚期胚胎细胞核染色

- 1) 囊胚期胚胎在含 1%多聚甲醛的 PBS 液滴中,室温下固定 5min;
- 2) 将固定好的胚胎移入 Hoechst33342 染色液滴中,室温下孵育 5min;
- 3) 用 5 $\mu\text{l}$  含 50%甘油的 PBS 在干净的载玻片上做一液滴;
- 4) 将孵育好的胚胎转移至液滴,注意尽可能少的带入染色液;
- 5) 然后在液滴上加盖盖玻片,并轻轻挤压以使细胞平铺于载玻片;
- 6) 荧光显微镜下观察计数并记录拍照。

#### 1.2.10 数据处理

每个实验重复 4~6 次,结果用 t 检验进行统计分析,  $P < 0.05$  为差异有显著性。



## 2 试验设计

### 2.1 实验一：小鼠 1 细胞胚胎的体外培养

分别采用 KM、B6D2F1 种小鼠和超排雌性 KM 小鼠合笼，收集洗净的 1 细胞胚胎，分别加入经过 CO<sub>2</sub> 培养箱平衡 2h 的 CZB、mKSOM 培养液中，在培养 48h 后将无糖 CZB 培养液中的胚胎移入含糖 CZB 培养液。胚胎培养用直径为 35mm 培养皿，于 37℃、95%湿度、5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 96h，每 24h 取出观察一次，并观察记录发育情况。发育到 96h 后选择形态较好的囊胚进行胚胎细胞数染色。

### 2.2 实验二：小鼠体外受精

分别收集 KM、B6D2F1 种小鼠的精子，在 HTF 获能液中获能 90min 后，加入已经含有卵丘卵母细胞复合物的受精液滴中，于 37℃、95%湿度、5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中受精 5~6h。受精结束后洗去透明带上黏附的少量精子，移入经过 CO<sub>2</sub> 培养箱平衡 2h 的 mKSOM 培养液中。在 37℃、95%湿度、5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 96h，每隔 24h 取出观察一次，并观察记录发育情况。以能够均等分裂为 2 细胞的胚胎判定为受精卵，并以此计算受精率。体外受精发育到 96h 后，选择形态较好的囊胚进行胚胎细胞数染色计数。并收集体内受精正常发育的囊胚，并对其进行胚胎细胞数染色计数。

表 3-1 小鼠和培养液对昆明小鼠 1 细胞胚胎体外发育的影响

Tab. 3-1 Effect of sperm and media on the development of KM mouse 1 cell embryos in vitro

精 子	培养液	胚胎 总数	2 细胞 (%±SEM)	4 细胞 (%±SEM)	桑椹胚 (%±SEM)	囊 胚 (%±SEM)
B6D2F1	CZB	75	72(95.8±1.2) <sup>a</sup>	64( 83.9±2. 9) <sup>a</sup>	56 (73.4±6. 4) <sup>a</sup>	50 (64.3±5. 2) <sup>a</sup>
	mKSOM	74	74(100±0. 0) <sup>a</sup>	64 (85.2±3. 5) <sup>a</sup>	57 (76.1±5. 6) <sup>a</sup>	53 (68.7±3. 2) <sup>a</sup>
KM	CZB	65	63(96.7±1. 7) <sup>a</sup>	58 (86.9±1. 9) <sup>a</sup>	51 (76.5±4. 6) <sup>a</sup>	42 (64.2±4. 1) <sup>a</sup>
	mKSOM	61	60(98.4±0. 8) <sup>a</sup>	54 (87.4±3. 1) <sup>a</sup>	52 (84.2±2. 3) <sup>a</sup>	46 (73.2±6. 3) <sup>a</sup>

各纵行的结果相比较，相同字母间表示差异无显著性 ( $P>0.05$ )

Columns marked with same letters have no difference ( $P>0.05$ )

## 3 结果

### 3.1 精子和培养液对昆明小鼠 1 细胞胚胎体外发育的影响

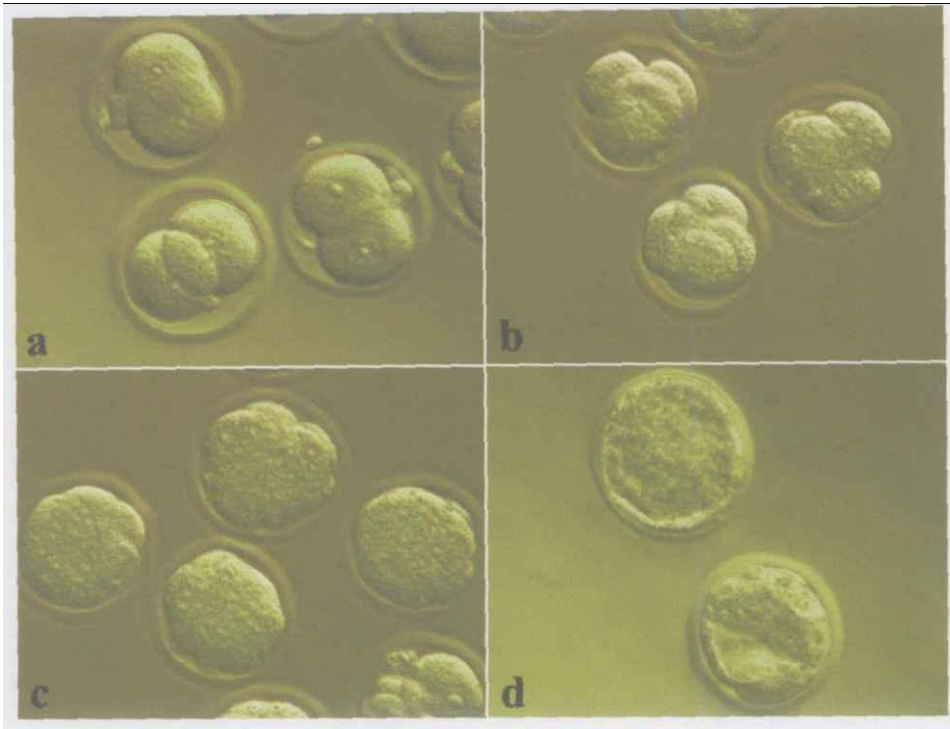


图 3-1 小鼠胚胎体外发育

(a) 2 细胞期; (b) 4 细胞期; (c) 桑椹胚; (d) 囊胚期

Fig. 3-1 Development of mouse embryos in vitro

(a) 2-cell stage; (b) 4-cell stage; (c) Morula; (d) Blastocyst

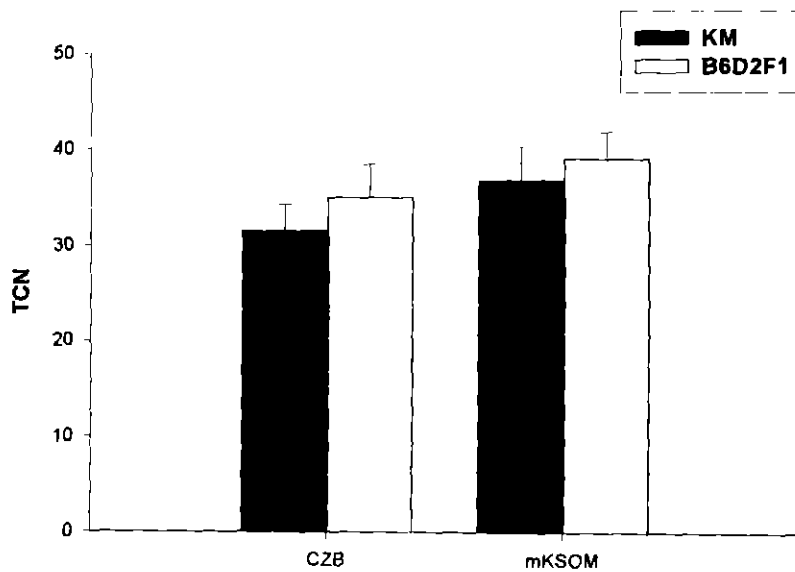


图 3-2 培养液和精子对囊胚期胚胎总细胞数的影响; TCN: 囊胚期胚胎总细胞数

Fig.3-2 Effect of sperm and media on total cell number of blastocyst, TCN. Total cell number of blastocyst

分别用 KM 和 B6D2F1 小鼠合笼后得到的 1 细胞胚胎在 CZB 和 mKSOM 培养液中进行早期培养, 不同阶段胚胎发育情况见表 3-1。从表 3-1 的结果可以看出 mKSOM 培养液也能较好的支持昆明小鼠胚胎体外发育, 并可以得到较高的囊胚率 (采用 B6D2F1 和 KM 种小鼠分别为 68.7%和 73.2%), 与相同条件下 CZB 培养液培养的结果没有显著差异 ( $P>0.05$ )。同时可以看出分别采用 KM 和 B6D2F1 种小鼠进行体内受精, 其对昆明小鼠 1 细胞胚胎体外卵裂率没有显著影响 ( $P>0.05$ )。

### 3.2 培养液和精子对囊胚期胚胎细胞数的影响

体内收集的 1 细胞胚胎分别在 CZB 和 mKSOM 培养液中进行体外培养后, 对囊胚期胚胎进行染色计数。用 KM 小鼠精子受精后得到的 1 细胞胚胎分别在 mKSOM 和 CZB 中进行培养, 囊胚期胚胎细胞数 36.7 和 31.5, 两组之间差异不显著 ( $P>0.05$ )。用 B6D2F1 小鼠精子受精后得到的 1 细胞胚胎分别在 mKSOM 和 CZB 中进行培养, 囊胚细胞数分别为 39 和 35, 两组之间差异不显著 ( $P>0.05$ )。比较 CZB 培养液中用 KM 和 B6D2F1 小鼠受精后体外发育到囊胚期的小鼠胚胎, 囊胚的细胞数分别为 31.5 和 35, 两组之间差异不显著 ( $P>0.05$ )。mKSOM 培养液培养 KM 和 B6D2F1 小鼠受精后的体外发育到囊胚期的小鼠胚胎, 囊胚的细胞数为 36.7 和 39, 两组之间的差异同样不存在显著性 ( $P>0.05$ )。结果表明采用这两种培养液体外培养小鼠胚胎, 最终得到的囊胚细胞数差异并不明显。这两种小鼠精子在体内受精后得到的 1 细胞胚胎, 在体外相同培养条件下培养得到的囊胚细胞数差异并不明显 (见图 3-2)。

表 3-2 精子对昆明小鼠体外受精的影响

Tab.3-2 Effect of sperm on the fertilization in vitro of KM mouse

精 子	受精用卵 子数	2 细胞 (%±SEM) <sup>†</sup>	4 细胞 (%±SEM) <sup>††</sup>	桑椹胚 (%±SEM) <sup>†††</sup>	囊 胚 (%±SEM) <sup>†††</sup>	囊胚细胞数 (N±SEM)(n)
B6D2F1	223	185(81.7±2.1) <sup>a</sup>	158(84.3±2.1) <sup>a</sup>	147(78.4±3.1) <sup>a</sup>	121(63.8±3.6) <sup>a</sup>	(36.7±2.8) <sup>a</sup> (15)
—	—	—	—	—	—	(41.5±1.2) <sup>c</sup> (13) <sup>*</sup>
KM	160	103(62.4±1.3) <sup>b</sup>	83(80.6±1.4) <sup>b</sup>	56(54.2±2.4) <sup>b</sup>	42(39.6±4.1) <sup>b</sup>	(30.5±2.4) <sup>b</sup> (20)
—	—	—	—	—	—	(43.2±1.8) <sup>c</sup> (11) <sup>**</sup>

“\*”为 KM×B6D2F1 胚胎体内正常发育到囊胚期胚胎细胞数; “\*\*”为 KM×KM 胚胎体内正常发育到囊胚期胚胎细胞数; “†”基于受精用的卵子数; “††”基于分裂为 2 细胞期的胚胎数; 各纵行的结果相比较, 不同字母间表示差异有显著性 ( $P<0.05$ )

“\*” Total cell number of KM×B6D2F1 embryos developmented to blastocyst stage in vivo; “\*\*” Total cell number of KM×KM embryos developmented to blastocyst stage in vivo; “†” Based on the total number of oocytes; “††” Based on the total number of 2-cell stage embryos; Columns marked with different letters have difference ( $P<0.05$ )

### 3.3 精子对昆明小鼠卵母细胞体外受精的影响

分别采用 B6D2F1 和 KM 小鼠精子对昆明小鼠体内成熟的卵母细胞进行体外受精, 受精卵

在 mKSOM 培养液中进行培养。不同阶段胚胎卵裂率见表 3-2。用 B6D2F1 鼠的精子得到的受精率为 81.7%，明显高于 KM 小鼠精子的受精率 62.4%，差异有显著性 ( $P < 0.05$ )。2 细胞期的胚胎在体外继续发育，发育到囊胚期的比例分别为 63.8% 和 39.6%，差异同样存在显著性 ( $P < 0.05$ )。同时由表 3-2 可以看出，体内受精后的 KM × B6D2F1 和 KM × KM 胚胎在体内正常发育到囊胚，它们的总细胞数没有显著差异 ( $P > 0.05$ )。但是它们与相应的体外受精后体外发育到囊胚期胚胎的总细胞数相比，存在显著差异 ( $P < 0.05$ )。

## 4 讨论

哺乳动物胚胎体外发育普遍存在发育阻滞现象。不同动物体外发育阻滞发生在不同时期，小鼠胚胎体外发育阻滞发生在 2 细胞期 (Whittingham *et al.*, 1967)。为了克服小鼠胚胎体外发育过程中出现的 2 细胞阻滞，Chatot 等人根据前人的经验推出了 CZB 培养液，它可以支持 1 细胞的 CF1 × B6D2F1/J 小鼠胚胎发育到桑椹胚 (Chatot *et al.*, 1989)。这种无糖的 CZB 培养液同样能使 64% 的昆明小鼠 1 细胞胚胎发育到桑椹胚，并有少量能继续发育到囊胚 (庞也非等, 1995)。在胚胎发育到 3 或 4 细胞阶段，加入葡萄糖或移入含糖的培养液中继续培养，多种品系的小鼠胚胎可以在体外成功发育到囊胚 (Chatot *et al.*, 1990)。也有研究采用 CZB 培养液培养昆明小鼠 1 细胞胚胎，结果很好克服了 2 细胞阻滞。如果胚胎发育到 4 细胞时期加入葡萄糖则可以 60% 的囊胚率 (严云勤等, 1995)。在本实验中我们也采用 CZB 液，体外培养 48h 后进行换液培养，也得到 67% 的囊胚率。

CZB 换液培养虽可以较好的克服小鼠 2 细胞阻滞，并得到较高的囊胚率。但是人们并不满足于当前的这种换液培养，因为早期胚胎在发育过程中从一种培养环境移入另外一种环境，这种培养环境的改变毫无疑问将会对胚胎的早期发育带来不利影响 (Summers *et al.*, 2000)。KSOM 培养液是在 SOM 培养液的基础上，将 NaCl 和 KCl 的浓度升高，它与 CZB 培养液最大差别就是整个培养过程始终都有葡萄糖的参与。KSOM 培养液比 SOM 和 CZB 培养液更好支持 1 细胞的 CF1 × B6D2F1/J 小鼠胚胎发育到囊胚 (Gregory *et al.*, 1995)。目前也有文献报道，KSOM 培养液在一定程度上可以克服昆明小鼠胚胎的 2 细胞阻滞 (刘莹等, 1999)。有研究比较了不同培养体系中小鼠胚胎 6-磷酸葡萄糖脱氢酶的表达，结果表明在 CZB 培养液中的小鼠胚胎存在其表达，而在 KSOM 培养液中的小鼠胚胎却没有这种酶的表达。这提示我们，不同培养体系中发育的小鼠胚胎具有不同的糖代谢途径 (张守全等, 2002)。当葡萄糖和 BSA 的浓度分别由 0.2mmol/l 和 1mg/ml 升高到 5.56mmol/l 和 4mg/ml 仍然可以有较高的囊胚率，而且在这种改进的 KSOM 培养液中可以同时完成小鼠体外受精和早期发育过程，这种培养液即 mKSOM (Summers *et al.*, 1995; Summers *et al.*, 2000)。本实验中我们尝试用 mKSOM 培养液对昆明小鼠 1 细胞胚胎进行体外培养，结果表明 mKSOM 可以很好的支持昆明小鼠胚胎体外发育，并能够得到较高的囊胚率。这提示我们，早期胚胎发育过程中糖代谢途径可能并不是引起小鼠 2 细胞阻滞和影响胚胎早期体外发育潜能的最关键的因素。这也要求我们进一步加深对哺乳动物胚胎发育的认识。

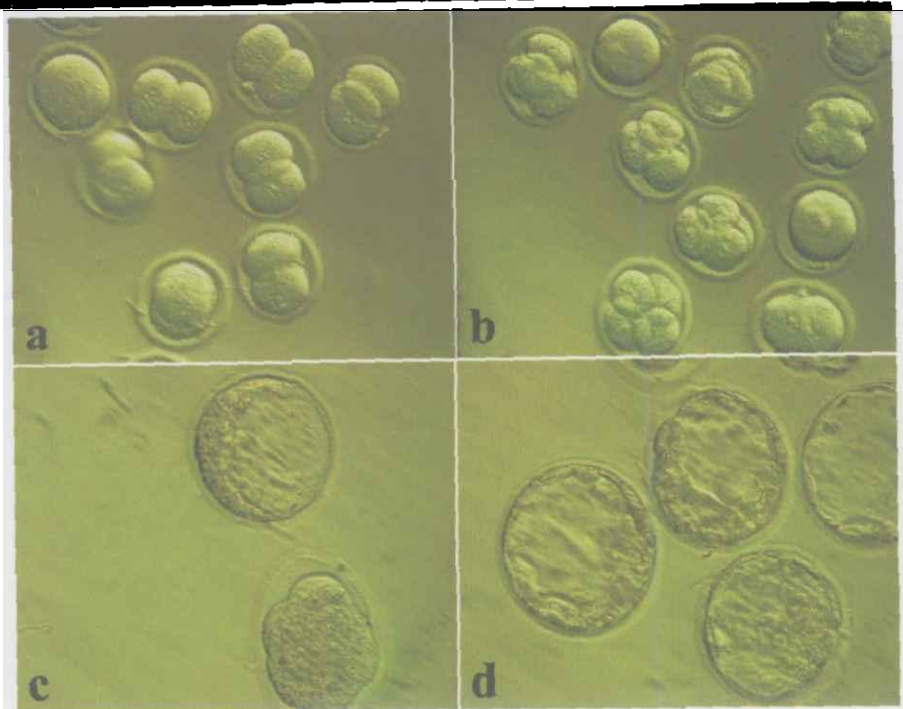


图 3-3 体外受精后小鼠胚胎体外发育  
(a) 2 细胞期; (b) 4 细胞期; (c) 桑椹胚; (d) 囊胚期

Fig. 3-3 Development of mouse embryos fertilized in vitro  
(a) 2-cell stage; (b) 4-cell stage; (c) Morula, (d) Blastocyst

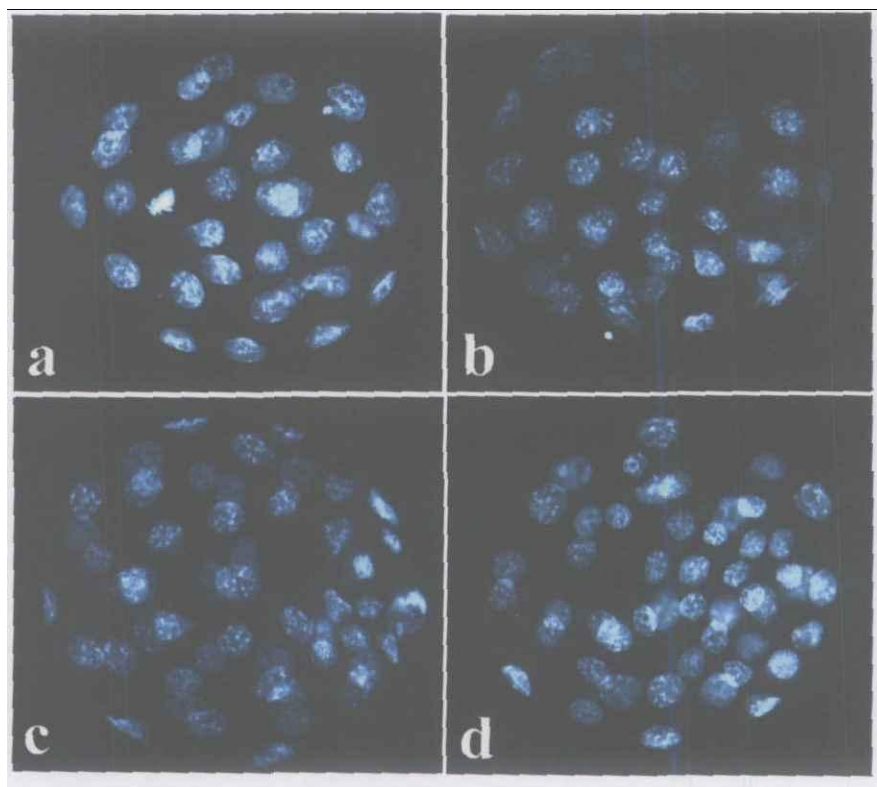


图 3-4 囊胚期胚胎总细胞数

(a) 体外受精后体外发育的 KM x B6D2F1 胚胎; (b) 体外受精后体外发育 KM x KM 胚胎; (c) 体内正常受精发育的 KM x B6D2F1 胚胎; (d) 体内正常受精发育的 KM x KM 胚胎

**Fig. 3-4** Total cell number of blastocyst

(a) KM×B6D2F1 embryos developed in vitro after IVF; (b) KM×KM embryos developed in vitro after IVF; (c) KM×B6D2F1 embryos fertilized and developed in vivo; (d) KM×KM embryos fertilized and developed in vivo

早期胚胎体外发育受很多因素的影响，除了与培养液成份有关以外，还与卵母细胞携带的遗传信息密切相关 (Goddard *et al.*, 1985)。然而最近的研究结果表明，精子携带的遗传信息也会对胚胎发育产生一定的影响 (Comizzoli *et al.*, 2000; Ward *et al.*, 2001; Denny *et al.*, 2004)。在本实验中，卵母细胞来源于目前公认的在早期发育过程中存在发育阻滞的昆明小鼠，精子分别来源于 B6D2F1 和 KM 小鼠。结果表明精子对小鼠胚胎的体外卵裂和囊胚期胚胎的细胞数不会产生显著的影响。这提示我们，这两种小鼠精子携带的遗传信息并没有影响到早期胚胎发育。同时我们比较了两种小鼠精子对体外受精的影响，结果发现精子对小鼠的体外受精率、囊胚率以及囊胚期胚胎细胞数产生显著的影响。结合已有关于昆明小鼠卵母细胞体外受精的报道 (尹海林等, 1989; 张嘉保等, 2001; 王敏康等, 2000; 乌日琴等, 2001; 汪凡等, 2002)，发现这些报道中由于采用不同品系的公鼠和体外受精体系其受精结果有明显的差异。所以我们推测，这种差异可能是由于不同品系小鼠精子对体外受精需求条件不同所致。

综上所述，本实验比较了 CZB 和 mKSOM 培养液对早期胚胎发育的影响，结果表明 mKSOM 是一种简短、高效的昆明小鼠胚胎体外培养体系。同时表明 B6D2F1 和 KM 公鼠精子不会影响昆明小鼠 1 细胞胚胎体外的发育，但是会对体外受精及其后期发育产生显著的影响。

## 第四章 小鼠子宫上皮细胞与胚胎共培养

**摘要：**为了进一步优化小鼠胚胎的体外培养体系和提高胚胎的质量，本实验建立了小鼠子宫上皮细胞单层，用子宫上皮细胞对体外受精后的小鼠胚胎进行共培养，观察了胚胎共培养对小鼠胚胎卵裂率、孵化率以及囊胚总细胞数的影响。结果表明，已建立的细胞单层上皮细胞纯度为92.6%。小鼠胚胎与子宫上皮细胞进行共培养，桑椹胚率、囊胚率、孵化率明显高于单一培养体系（71.3%对61.2%，50.3%对39.7%，34.8%对24.3%， $P<0.05$ ）。同时囊胚总细胞数由35.6提高到44.1（ $P<0.05$ ）。通过本实验，我们建立了小鼠胚胎的体细胞共培养体系，同时表明共培养体系促进了小鼠胚胎体外发育。

**关键词：**体外受精，子宫上皮细胞，胚胎共培养

在首例哺乳动物的胚胎体外发育成功以来，多种动物的胚胎在体外发育均获得了成功。哺乳动物的胚胎体外培养技术也得到不断的发展。胚胎体外培养最传统的方法是采用简单的化学培养基。这种传统的胚胎培养常见的有BOMC2、M16、CZB等培养液，它们都可以很好的支持小鼠胚胎的体外发育（Biggers, 1998）。Earle氏平衡盐溶液加入10%灭活的人血清，可以较好的支持人胚胎体外发育到囊胚，但令人失望的是仅有7%的胚胎在移植后成功着床（Bolton *et al.*, 1991）。这表明胚胎培养体系对胚胎的质量具有决定性的作用。因此几十年来人们一直努力完善胚胎体外培养体系。

机体内环境在胚胎发育过程中的重要作用很早受到人们的重视（Bavister, 1988）。早期在上个世纪60年代，人们就开始尝试用体细胞和胚胎共培养来模拟体内发育环境，结果取得了很好的效果（Biggers *et al.*, 1962）。胚胎与体细胞共培养也由此成为一种有效的胚胎体外培养途径。到目前为止已经有很多关于体细胞与胚胎共培养的成功报道，这些报道采用不同的体细胞，其中以采用生殖道细胞的效果最佳（Carnegie, *et al.*, 1999; Yeung, *et al.*, 2002）。子宫是早期胚胎发育的场所，而且取材容易，所以在众多的体细胞中子宫内膜细胞是首选的细胞类型。采用子宫内膜细胞与胚胎共培养，囊胚的形成率和孵化率最高（Desai *et al.*, 1994）。尽管这种作用的机制还不清楚，但生殖医学中已有临床报道（Mercader *et al.*, 2003; Carlos *et al.*, 1999; Jayot *et al.*, 1995）。

本实验首先建立小鼠子宫上皮细胞单层，然后采用上皮细胞与体外受精的小鼠胚胎进行共

培养, 希望通过与体细胞共培养来优化胚胎的体外培养体系。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物与试剂

#### 1.1.1 实验动物

4~6 周龄的雌性、10 周龄的雄性昆明小鼠购于中国科学院遗传与发育所实验动物中心。

#### 1.1.2 主要试剂

所用试剂分别购至以下公司: 孕马血清促性腺激素 (PMSG) 和人绒毛膜促性腺激素 (hCG) 购自宁波市激素制品有限公司; 丙酮酸钠、60% 乳酸钠、葡萄糖、HEPES、NaCl、KCl、NaHCO<sub>3</sub>、EDTA·Na<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O、MgSO<sub>4</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、牛血清白蛋白 (BSA)、石蜡油、透明质酸酶、DMSO、3-3'-二氨基联苯胺 (DAB)、多聚赖氨酸、Hoechst33342 均为美国 Sigma 公司生产 (St Louis, MO, USA); MEM 培养基为 (GIBCO, USA); 青霉素、链霉素购至华北制药有限公司; 胎牛血清 (FBS) 为杭州四季青生物工程公司产品; 兔抗人的角蛋白多克隆抗体工作液 (Novacastra, UK); 生物素标记的羊抗兔 IgG (GAR-B, Zymed, USA); 辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素 (SP-HRP, Zymed, USA)。

#### 1.1.3 仪器设备

普通冰箱、CO<sub>2</sub> 培养箱 (Sanyo)、-80℃ 超低温冰箱 (Thermo)、Milli-Q 超纯水仪装置、解剖显微镜 (Motic)、荧光显微镜 (Leica)、倒置显微镜 (Leica)、数码相机 (Canon)、千分之一电子天平 (Yamatoz)、超净工作台、高速离心机、恒温水浴箱、PHS-3C 型精密 pH 计、KQ-500 型超声波清洗器、全自动压力蒸汽消毒锅、恒温台。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 溶液的配制

- 1) 双抗储存液 (储存液浓度  $8 \times 10^4$  IU/ml 青霉素 +  $1 \times 10^5$  IU/ml 链霉素): 青霉素 ( $8 \times 10^5$  IU) 和链霉素 ( $1 \times 10^6$  IU) 各一瓶, 溶于 10ml 的 Milli-Q 超纯水, 过滤除菌, 分装后 4℃ 保存。
- 2) MEM 细胞培养基: MEM 粉末 0.95g, NaHCO<sub>3</sub> 0.22g, 双抗储存液 0.1ml, 100ml Milli-Q 超纯水定容, pH 7.0~7.2, 过滤除菌, 4℃ 保存。使用时按 10% 浓度添加 FBS。
- 3) 无钙镁磷酸盐溶液 (PBS): KCl 0.02g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.02g, NaCl 0.8g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 0.288g, 100ml Milli-Q 超纯水定容, pH 7.0~7.2, 高压灭菌, 4℃ 保存。
- 4) 0.01M 磷酸盐缓冲液 (PBS) 的配置
  - (1) 0.2M 磷酸盐储存缓冲液:



- A 液 0.2M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ : 31.2g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 加蒸馏水溶解后定容至 1000ml;
- B 液 0.2M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ : 71.632g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 加蒸馏水溶解后定容至 1000ml;
- C 液 0.2M pH7.4 的磷酸盐储存液: 19ml A 液加 81ml B 液, 调整其 pH 值为 7.4。
- (2) 0.01M 磷酸盐缓冲液(PBS): 上述 0.2M pH7.4 的磷酸盐储存液 50ml, 加 8.0g NaCl, 加蒸馏水定容至 1000ml。
- 5) 胰蛋白酶/EDTA 消化液: MEM 粉末 0.95g, 胰蛋白酶 0.25g, EDTA·Na<sub>2</sub> 0.02g, 葡萄糖 0.1g, BSA 0.05g, 双抗储存液 0.1ml, Milli-Q 超纯水定容至 100ml, 过滤除菌, 分装-20℃ 保存。
- 6) 细胞冻存液: MEM 粉末 0.475g, 双抗储存液 0.5ml, Milli-Q 超纯水定容至 50ml。过滤除菌后添加 14.25ml FBS 和 7.13ml DMSO, 4℃ 保存。
- 7) 4%多聚甲醛固定液:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  16.88g, NaOH 3.86g, 多聚甲醛 40g, 蒸馏水 800 ml, 调节 pH 值 7.4, 加蒸馏水定容至 1000ml。
- 8) 0.5M Tris-HCl 贮存液 (TB) (pH7.4): Tris 60.57g, 蒸馏水 800ml, 浓盐酸调整调 pH 值 7.4 后定容至 1000ml, 4℃ 储存。
- 9) DAB 显色液的配制: DAB 1mg, 0.05M TB 2ml, 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  2 $\mu\text{l}$ 。
- 10) 苏木精染料的配制: 苏木精 2g, 无水乙醇 100ml, 冰醋酸 10ml,  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  5.51g, 甘油 100ml, 蒸馏水 100ml, 摇匀室温下放置两周以上。
- 11) 其它溶液的配制见第三章。

### 1.2.2 动物饲养

动物房内设置光周期 8:00~20:00, 暗周期 20:00~8:00。饲养温度为 20~25℃。自由采食与饮水。

### 1.2.3 雌鼠超数排卵

选择发情间期的昆明雌鼠腹腔注射 PMSG, 5IU/只; 46h 后再按照 5IU/只的剂量腹腔注射 hCG (发情周期的鉴定见第三章)。超排雌鼠在注射 hCG 后立即与种公鼠合笼 (雌鼠:雄鼠=1:1)。次日上午 8:00 检查阴栓, 见栓当天为第一天 (D1)。

### 1.2.4 小鼠子宫上皮细胞的分离和原代培养

- 1) 颈部脱臼法处死妊娠 D2 天的孕鼠, 在无菌条件下摘取小鼠的子宫;
- 2) 在超净工作台上将子宫组织在无钙镁的 PBS 中洗去血块和黏液, 在 6 倍的解剖镜下用眼科剪去除组织周围的脂肪块和血管;
- 3) 在解剖镜下沿子宫腔将其纵向切开, 内膜面朝上展平与培养皿中。加入消化液, 37℃ 消化 30min, 每隔 5min 小心晃动平皿一次;
- 4) 消化结束后轻轻吹打组织块, 挑出大块组织, 按 10% 的浓度加入 FBS 终止消化, 将消化液转移至含 10ml PBS 的离心管中静置 10min;
- 5) 弃去上层 2/3 液, 下层液 500g 离心 10min; 离心结束后弃去上清液, 用培养液重新悬浮细胞, 500g 离心 10min。重复此操作清洗细胞两遍;

- 6) 检查细胞悬液中细胞密度, 并将其密度调整到  $5 \times 10^5$  个细胞/ml;
- 7) 以 0.5ml/孔将细胞接种于 24 孔培养板中, 置入  $37^\circ\text{C}$ 、95%湿度、5% $\text{CO}_2$  的培养箱中培养;
- 8) 第二天下午小心吸去旧培养液, 加入 0.5ml 的新鲜培养液, 放入  $37^\circ\text{C}$ 、95%湿度、5% $\text{CO}_2$  的培养箱中继续培养。以后每隔 2 天换一次液。

#### 1.2.5 细胞的冷冻保存

- 1) 在接种后第 5 天, 细胞已完全生长汇合。弃掉旧的培养基, 用无钙镁的 PBS 轻缓漂洗细胞 2 次, 尽量洗去残余血清;
- 2) 加入胰蛋白酶/EDTA 消化液, 立即放在倒置镜下观察。待到细胞开始变为圆形, 在没有漂起时弃去消化液, 并立即加入 1ml 的培养液终止消化;
- 3) 用枪头轻轻吹打贴壁的细胞, 将悬液收集于离心管中, 500g 离心 10min;
- 4) 弃去上清液, 加入  $4^\circ\text{C}$  预冷的细胞冻存液, 并将细胞的密度调整为  $5 \times 10^6$ /ml;
- 5) 每冻存管分装 1ml, 盖好, 并做好标签。
- 6) 先将冻存管置入  $4^\circ\text{C}$  的普通冰箱, 放置 40min;
- 7)  $-20^\circ\text{C}$  放置 2h; 然后放入  $-80^\circ\text{C}$  下过夜;
- 8) 次日将冻存管投入液氮长期保存;
- 9) 最后做好冻存记录。

#### 1.2.6 细胞的复苏

- 1) 调配  $37\sim 40^\circ\text{C}$  的温水;
- 2) 从液氮中取出冻存管, 立即投入温水中并快速的晃动, 使细胞在 1~2min 内完成复温过程;
- 3) 将细胞的冻存液移入离心管, 加入约 5ml 的培养基, 并用枪头混匀;
- 4) 将细胞悬液以 500g 离心 10min, 弃去上清液;
- 5) 加入适量细胞培养液使细胞达到需求的密度, 轻轻吹打使细胞混匀;
- 6) 将细胞悬液接种于培养板, 放入  $\text{CO}_2$  的培养箱中进行培养。

#### 1.2.7 上皮细胞角蛋白的免疫染色

- 1) 子宫上皮细胞接种于多聚赖氨酸包被的盖玻片上, 放入  $\text{CO}_2$  的培养箱中进行培养;
- 2) 待细胞单层形成以后取出盖玻片, 用预冷的 PBS 漂洗 2 次;
- 3) 在含有 4%多聚甲醛的 PBS 液中室温下固定 30min;
- 4) 用含 3%的  $\text{H}_2\text{O}_2$  的 PBS 在室温下封闭 30min;
- 5) 取出盖玻片在 PBS 中洗 3 次, 每次 5min, 擦去边缘多余水分;
- 6) 添加 10%的正常羊血清, 室温下在湿盒内放置 40min;
- 7) 轻轻甩掉血清, 添加一抗工作液, 置于湿盒内  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜;
- 8) 次日将盖玻片在 PBS 中漂洗 3 次, 每次 5min, 擦干边缘水分;
- 9) 加稀释好的生物素标记的羊抗兔的 IgG (GAR-B, 1:150), 放于湿盒内室温孵育 2h;

- 10) 将盖玻片在 PBS 中漂洗 3 次, 每次 5min, 擦干边缘水分;
- 11) 加稀释好的辣根过氧化物酶标记的链酶亲和素 (SP-HRP, 1:200), 放于湿盒内室温孵育 2h;
- 12) 将盖玻片在 PBS 中漂洗 3 次, 每次 5min, 擦干边缘水分;
- 13) 加入 DAB 显色液, 显微镜下控制显色的强度;
- 14) 苏木精染液进行复染, 10 Sec 后, 于自来水中漂洗 5min;
- 15) 30%、50%、70%、95%、100%的梯度酒精脱水, 二甲苯透明后中性树胶封片。

### 1.2.8 小鼠体外受精

#### 1) 小鼠的准备

10 周龄的 KM 种小鼠每隔 3~4 天交配一次。选取具有生殖能力的种小鼠, 在处死取精子前三天停止进行交配。

#### 2) 体外受精 (见第三章)

### 1.2.9 胚胎培养和胚胎的体细胞共培养

接种于 96 孔板的子宫上皮细胞培养 2 天后, 细胞单层开始形成, 细胞已经长至培养孔面积的 80%。在进行共培养前 2h 弃去旧培养基, 用含 0.4% BSA 的 mKSOM 培养基润洗细胞两次, 加入新鲜 mKSOM 培养基。同时在没有上皮细胞单层的培养孔中也同样加入新鲜 mKSOM 培养基, 将培养板置于 CO<sub>2</sub> 培养箱培养预热 2h。胚胎共培养时, 将受精卵随机放入各培养孔中, 每孔放入 15~20 个胚胎。置入 37℃、95%湿度、5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。每隔 36h, 每个培养板孔更换为相应的新鲜培养基。每日取出培养板在倒置显微镜下观察胚胎的发育情况, 并记录拍照。

### 1.2.10 囊胚期胚胎细胞核染色 (见第三章)

### 1.2.11 数据处理

每组实验重复 4~6 次, 结果用 t 检验统计进行分析,  $P < 0.05$  为差异有显著性。

## 2 试验设计

### 2.1 实验一: 小鼠子宫上皮细胞单层的建立

取妊娠 D2 天孕鼠的子宫, 采用胰酶消化法分离细胞。体外条件下生长 3~4 天即可形成细胞单层。为了进一步鉴定单层中上皮细胞的纯度, 对上皮细胞特异的细胞角蛋白进行免疫细胞化学染色, 苏木精复染后统计单层中上皮细胞的纯度。

## 2.2 实验二：小鼠胚胎体细胞与胚胎共培养

冷冻复苏后的上皮细胞在接种一天后，大约 80% 的细胞已经生长汇合成单层。在进行胚胎共培养前 2h 弃去旧培养基，用胚胎培养液润洗细胞单层 2 次，再加入新鲜胚胎培养液。同时在不含单层细胞的培养孔中也加入同样的培养液，以此作为对照。培养时每孔放入 15~20 个胚胎。统计不同阶段胚胎卵裂率和囊胚期胚胎总细胞数，并拍照。

# 3 实验结果

## 3.1 小鼠子宫上皮细胞单层的建立

取妊娠 D2 天孕鼠的子宫，采用胰酶消化法对上皮细胞进行分离，体外培养后形成子宫上皮细胞单层（图 4-1）。通过光镜，我们对上皮细胞的形态进行了观察。胰酶消化后的子宫内膜上皮细胞呈团块状或葡萄状，接种 24h 后仍有部分漂浮。3 天后细胞成团生长，排列紧密，细胞生长至培养孔的 80% 左右。单个的上皮细胞呈蝌蚪状。生长至第 5~6 天后铺满培养板底，此时上皮细胞已经失去细胞形态，细胞完全汇合为单层。

## 3.2 子宫内膜上皮细胞单层的细胞角蛋白的免疫染色

为了进一步鉴定细胞单层中上皮细胞的纯度，采用上皮细胞特异的细胞角蛋白抗体对细胞单层进行免疫细胞化学染色。染色结果表明：细胞角蛋白存在于细胞质，阳性染色为棕色，主要分布在胞质区域。为了进一步统计阳性率，免疫染色后对细胞用苏木精进行复染。细胞核在复染后呈现为兰色（图 4-2）。显微镜下随机选择 6 个不同的区域（ $\times 200$ ），数出单位面积内细胞总数和细胞角蛋白免疫染色阳性细胞数。统计结果表明，细胞单层中上皮细胞纯度为 92.6（ $\pm 0.8$ ）%。

## 3.3 小鼠子宫内膜上皮细胞与胚胎共培养

体外受精后小鼠胚胎分别采用了两种培养体系进行体外培养，不同阶段的胚胎发育情况和囊胚期胚胎总细胞数如表 4-1 所示。结果表明共培养体系中小鼠胚胎的桑椹胚率和囊胚率分别为 71.3% 和 50.0%，明显高于单一培养体系相应阶段的胚胎卵裂率（61.2% 和 39.7%， $P < 0.05$ ）。胚胎共培养体系中囊胚期胚胎总细胞数明显高于单一培养体系的结果（ $P < 0.05$ ）。囊胚期的胚胎继续进行 48h 培养后，胚胎的体细胞共培养体系和单独培养体系中囊胚的孵化率分别为 34.8% 和 24.3%，两组之间差异显著（ $P < 0.05$ ）。

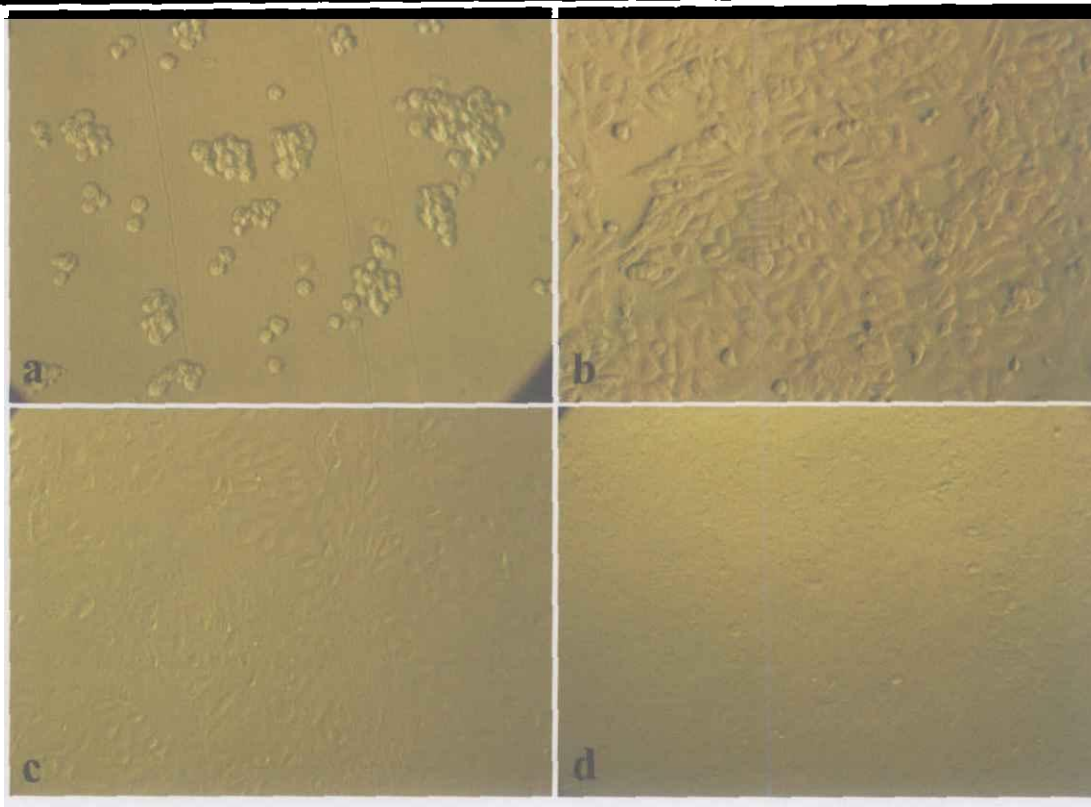


图 4-1 体外培养的小鼠子宫上皮细胞

(a) 消化分离得到的细胞团块；(b) 生长至第 3 天的细胞单层；(c) 生长至第 4 天的细胞单层；  
(d) 生长至第 6 天的细胞单层

Fig. 4-1 Mouse uterine epithelial cell (UEC) cultured in vitro

(a) Epithelial plaques dislodged from the endometrium; (b) The monolayer of UEC cultured 3 days in vitro;  
(c) The monolayer of UEC cultured 4 days in vitro; (d) The monolayer of UEC cultured 6 days in vitro

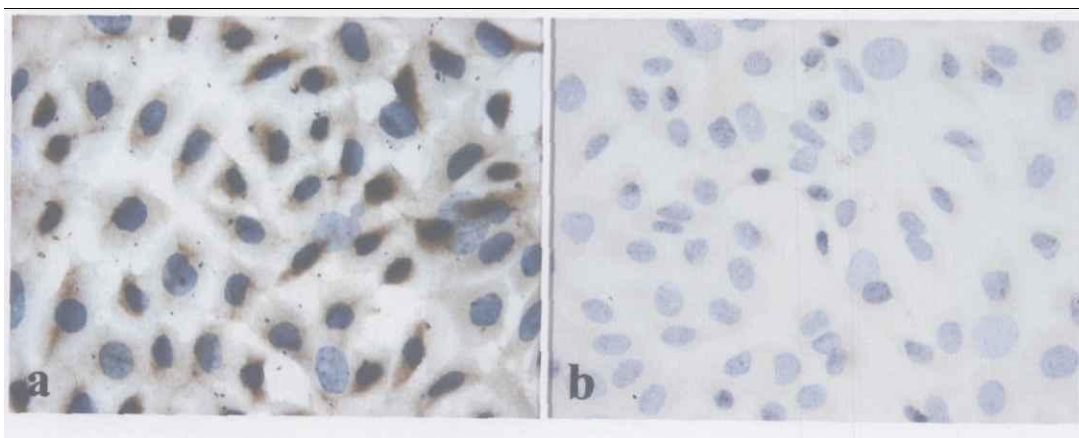
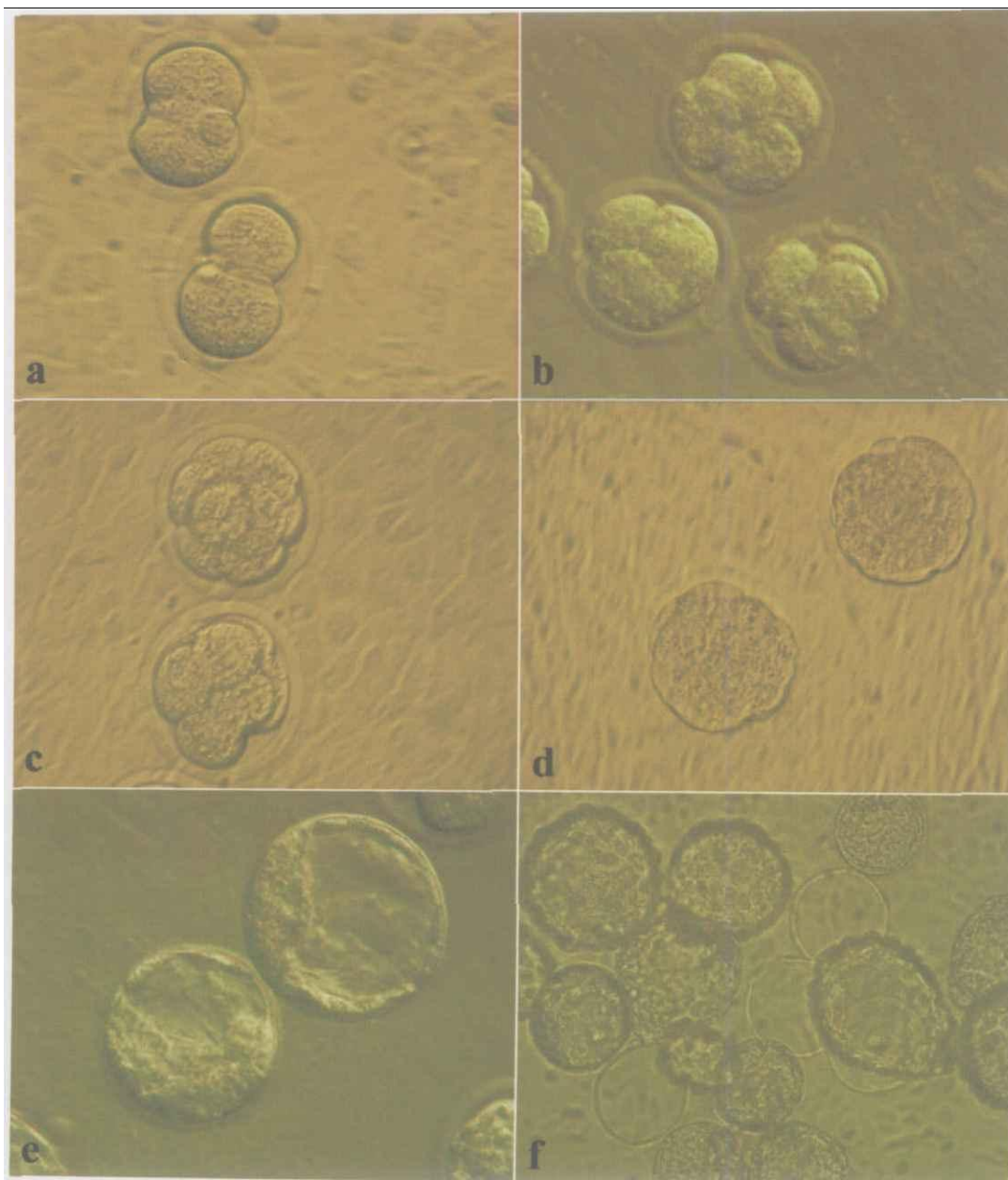


图 4-2 小鼠子宫上皮细胞单层的细胞角蛋白免疫染色

(a) 细胞单层的细胞角蛋白免疫染色；棕色为细胞角蛋白免疫染色阳性区域；兰色为细胞核复染结果；  
(b) 细胞单层用 PBS 代替一抗免疫染色（对照）

**Fig. 4-2** Immuno-staining for cytokeratin of the epithelial monolayer

(a) Immunocytochemical staining of cytokeratin in the monolayer; the brown is the result of the positive staining of cytokeratin in cytoplasm; the blue is hematoxylin staining in nuclei; (b) Immuno-staining substituted the first antibody with phosphate-buffered saline (control)



**图 4-3** 胚胎共培养发育至不同时期的小鼠胚胎

(a) 2 细胞; (b) 4 细胞; (c) 8 细胞; (d) 桑椹胚; (e) 囊胚; (f) 孵化囊胚

**Fig. 4-3** Different stages of mouse embryo cocultured in vitro

(a) 2-cell stage; (b) 4-cell stage; (c) 8-cell stage; (d) Morula; (e) Blastocyst; (f) Hatched blastocyst

表 4-1 体细胞与胚胎共培养对胚胎体外发育的影响

Tab.4-1 Effect of coculture with somatic cell on the development of embryo in vitro

培养体系	受精卵数	2 细胞	4 细胞	桑 椹 胚	囊 胚		孵化胚胎
		(M±SEM) %	(M±SEM) %	(M±SEM) %	(M±SEM) %	(N±SEM) * (n)	(M±SEM) %
共培养	167	(86.3±2.3) <sup>a</sup>	(78.2±3.1) <sup>a</sup>	(71.3±2.9) <sup>a</sup>	(50.0±3.0) <sup>a</sup>	(44.1±2.7) <sup>a</sup> (21)	(34.8±3.2) <sup>a</sup>
单一培养	143	(83.4±3.0) <sup>a</sup>	(74.1±3.2) <sup>a</sup>	(61.2±2.2) <sup>b</sup>	(39.7±3.2) <sup>b</sup>	(35.6±2.4) <sup>b</sup> (24)	(24.3±3.6) <sup>b</sup>

“\*”为囊胚期胚胎总细胞数；各纵行的结果相比较，不同字母间表示差异有显著性 (P<0.05)

“\*\*” The total cell number of blastocyst; Columns marked with different letters have difference (P<0.05)

## 4 讨论

在本实验中，我们对小鼠子宫上皮细胞进行分离培养，建立了上皮细胞单层。对所形成的细胞单层进行纯度鉴定，结果表明细胞单层上皮细胞的纯度为 92.6 (±0.8) %。采用上皮细胞和体外受精后的小鼠胚胎进行共培养，桑椹胚率、囊胚率及孵化率显著高于单一培养 (71.3% 对 61.2%，50.3%对 39.7%，34.8%对 24.3%，P<0.05)。同时囊胚期胚胎细胞数由 35.6 提高到 44.1 (P<0.05)。通过本实验，我们掌握了建立小鼠子宫上皮细胞单层的方法；对体外受精的小鼠胚胎进行共培养，明显促进了胚胎体外发育。

胚胎共培养是将体细胞作为营养细胞与胚胎共同培养，目前已经成为一种有效的胚胎体外培养途径。早在上个世纪 60 年代，有人用小鼠输卵管对其胚胎进行体外培养获得成功以来，胚胎共培养就受到人们的关注，但其发展速度仍然很慢 (Biggers *et al.*, 1962)。现在已有很多关于胚胎共培养的成功报道，这些报道中以采用生殖道细胞取得的效果最好 (Carnegie, *et al.*, 1999; Yeung, *et al.*, 2002)。子宫是早期胚胎发育的场所，且取材容易，所以子宫内膜细胞是首选的共培养细胞类型。也有人尝试对不同类型的体细胞与胚胎共培养的结果进行比较，结果表明采用子宫内膜细胞与胚胎共培养，囊胚的形成率和孵化率最高 (Desai *et al.*, 1994)。因此本实验选取的共培养细胞为妊娠小鼠的子宫上皮细胞。子宫内膜细胞的培养用于妇产科学、生殖医学等多种研究领域，可以避开子宫内膜不同成分对刺激反应的不一致，以及人体实验和动物模型进行研究所带来的伦理学问题。因此子宫内膜上皮细胞的体外培养具有很重要的意义。目前对细胞的分离和培养已有很多相关报道，但是各种方法的复杂程度不一 (Matthews *et al.*, 1992; Wegner *et al.*, 1992; Cai *et al.*, 2000)。本实验参考 Wegner 和 Cai 等人的方法，对小鼠子宫上皮细胞进行分离培养，体外培养 3 天后细胞单层开始形成，且细胞单层中上皮细胞的纯度可以达到 92.6%。

为了优化小鼠胚胎体外培养体系，我们将小鼠胚胎与子宫上皮细胞进行共培养。胚胎共培养体系中 71.3%的受精卵发育到桑椹胚，50%的发育到囊胚期，囊胚的孵化率为 34.8%。而对照组中只有 61.2%发育至桑椹胚，39.7%发育到囊胚期，囊胚的孵化率仅为 24.3%。胚胎细胞数量不能直接反映胚胎的发育能力，但能够间接反映胚胎体外培养条件和培养环境的好坏，并得到

广泛的应用 (Jones, 2000)。我们比较了共培养对囊胚期胚胎总细胞数的影响, 结果表明胚胎共培养体系中囊胚期胚胎的总细胞数明显高于单一培养体系。

目前已有更多关于胚胎共培养的研究, 但作用的机制仍然还不完全清楚。胚胎共培养作用的可能机制主要有三种: 第一, 胚胎共培养体系中体细胞可以分泌一些对早期胚胎发育有利的物质。其中研究较多的是一些生长因子和糖蛋白。用于胚胎共培养的非洲绿猴肾细胞、输卵管和子宫内膜上皮细胞能够分泌一些特殊的物质, 已分离出来的因子有: 白细胞介素-1, 2, 6、胰岛素生长因子、白血病抑制因子、表皮生长因子、转化生长因子等。这些因子都能促进哺乳动物胚胎生长发育 (Jayot *et al.*, 1995)。最近, 有科学家从人输卵管细胞条件培养液中提取出三种高分子量糖蛋白, 同时发现它们能够促进小鼠胚胎的对体外发育 (Liu *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1998)。第二, 通过体细胞来消除胚胎培养过程中一些不利因素, 从而促进早期培养发育。其中包括螯和重金属离子, 代谢掉胚胎发育的抑制物如次黄嘌呤等。牛输卵管上皮细胞能够合成一些抗氧化酶使自由基发生代谢变化, 提高胚胎发育 (Harvey *et al.*, 1995)。牛磺酸具有抗氧化作用, 它可以促进早期胚胎发育 (Devreker *et al.*, 1999; Dumoulin *et al.*, 1992)。而体外培养的上皮细胞可以分泌这种氨基酸 (Ouhibi *et al.*, 1990)。第三, 体细胞可能通过与胚胎的接触促进胚胎发育。胚胎与体细胞发生接触的共培养体系, 明显促进了胚胎体外发育 (Joo *et al.*, 2001)。但目前又有研究表明, 体细胞与胚胎不发生接触也能促进胚胎体外发育 (Rehman *et al.*, 1994)。所以这种调节方式还没有得到一致的认可。

通过本实验, 我们掌握了小鼠子宫上皮细胞单层的建立方法, 建立了小鼠胚胎体外共培养模型, 为以后进一步研究哺乳动物胚胎体外发育奠定了基础。



## 第五章 雌激素对早期胚胎发育的影响

**摘要:** 本实验采用 RT-PCR 和免疫细胞化学方法对 ER $\alpha$  在小鼠早期胚胎的表达进行了系统研究。RT-PCR 研究结果表明, 不同时期的小鼠胚胎都有 ER $\alpha$  mRNA 的表达。2 细胞期 ER $\alpha$  mRNA 表达水平明显低于 1 细胞期 ( $P < 0.05$ ), 但 4 细胞期其表达水平开始回升, 并在囊胚期达到最大。免疫细胞化学结果表明, 8 细胞期以后的小鼠胚胎都有 ER $\alpha$  表达。此外观察了雌激素对小鼠早期胚胎体外发育的影响。结果显示, 共培养体系中 50pg/ml 的 17 $\beta$ -雌二醇可以显著提高囊胚率、孵化率以及囊胚总细胞数 ( $P < 0.05$ ), 然而在单一培养体系中, 这种差异并不显著 ( $P > 0.05$ )。本实验的结果表明, 早期的小鼠胚胎就有 ER $\alpha$  表达, 这提示雌激素对胚胎发育的调节需要上皮细胞的参与。

**关键词:** 小鼠胚胎, 雌激素受体  $\alpha$ , 子宫上皮细胞, 胚胎共培养

哺乳动物早期胚胎发育是一个复杂而又精密的过程, 可能受到下丘脑-垂体-卵巢性腺轴激素的直接或间接调控。妊娠动物如果缺少这些激素, 将会影响胚胎正常发育和妊娠 (Francisco *et al.*, 1999; Patsoula *et al.*, 2001; Sabine *et al.*, 2001)。尤其是卵巢分泌的雌激素, 为母体生殖道的周期性变化和妊娠过程所必需 (Tan *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 2003)。很多研究表明, 妊娠动物缺乏雌激素则会表现为胚胎进入子宫的延迟、胚胎在子宫受到排斥和发育阻断 (Wu *et al.*, 1971)。因此雌激素在早期胚胎发育过程中的作用及其机制的研究受到人们广泛的关注。

尽管早期的研究就表明雌激素在早期胚胎发育中具有重要作用, 然而这些激素究竟是直接作用于胚胎, 还是通过母体间接作用于胚胎并不清楚。雌激素必须通过其受体才能起作用, 因而进一步研究 ER 在早期胚胎的表达对深入认识雌激素在胚胎发育过程中的作用显得格外重要。已有的研究表明小鼠早期胚胎就有 ER $\alpha$  mRNA 的表达 (Hou *et al.*, 1993; Hisahiko *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 1992), 但到目前为止还没有人对植入前小鼠胚胎 ER 蛋白的表达进行系统报道。

本实验采用 RT-PCR 和免疫细胞化学方法首先对植入前小鼠胚胎 ER $\alpha$  的表达进行系统研究, 然后运用胚胎共培养模型进一步研究雌激素对小鼠胚胎体外发育的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物与试剂

#### 1.1.1 实验动物（见第四章）

#### 1.1.2 主要试剂

鼠抗人雌激素受体 $\alpha$ (ER $\alpha$ )单克隆抗体(Novacastra, UK);生物素标记羊抗鼠IgG (GAM-B, Zymed, USA)、辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素 (Zymed, USA); 3-3'-二氨基联苯胺 (DAB, Sigma, USA) 和 17 $\beta$ -雌二醇 (Sigma, USA); Igepal (Sigma, USA); DTT (ICN, USA); dNTP (天为时代); RNA 酶抑制剂 (天为时代); DEPC (赛百盛); DNA 聚合酶 (天为时代); M-MLV 反转录酶 (Promega, USA); Oligo(dT)<sub>15</sub> (Promega, USA); 其它试剂同第四章。

#### 1.1.3 仪器设备

梯度PCR仪 (Bio-Rad); 电泳仪 (Bio-Rad); 低速离心机 (Eppendorf); 微波炉; DK-8D 电热恒温水槽; 制冰机; 其它设备同第四章。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 溶液的配制

- 1) 0.5M EDTA 储存液 (pH 8.0): 称取 EDTA 18.6g, 加热溶解于 85ml 双蒸水, 容量瓶中定容至 100ml, NaOH 调节溶液的 pH 值为 8.0, 4℃ 保存。
- 2) 50×TAE 存储液: 24.2g Tris 溶于 70ml 双蒸水, 添加 10ml 0.5M EDTA 和 5.72ml 的冰醋酸, 定容至 100ml, 4℃ 保存。
- 3) 0.8%琼脂糖胶的配制: 0.4g 的琼脂糖溶于 50ml 的 1×TAE 缓冲液, 微波炉煮 3~4 分钟, 冷却至 80℃, 加入 EB 3 $\mu$ l 混匀进一步冷却后即可制胶。
- 4) 无钙镁的 PBS 溶液 (0.5%BSA): KCl 0.02g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.02g, NaCl 0.8g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 0.288g, 100ml Milli-Q 超纯水定容, pH 7.0~7.2, 高压灭菌, 4℃ 保存。使用时取出 10ml 加入 0.05g BSA, 过滤灭菌备用。
- 5) 0.1M DTT 储存液: 称取 0.3856g 的 DTT 溶于 25ml 双蒸水中, 混匀后-20℃ 保存。
- 6) 细胞裂解液: 取 0.8ml 的 Igepal, 5ml 0.1M 的 DTT 于 94.2ml 的双蒸水中, 水浴 60℃ 助其融化, 使用前按 1U/ $\mu$ l 的量加入 RNAsin。

#### 1.2.2 动物饲养和处理（见第四章）

#### 1.2.3 小鼠子宫内膜上皮细胞的分离和培养（见第四章）

1.2.4 上皮细胞角蛋白的免疫染色（见第四章）

1.2.5 2 细胞胚胎的收集

注射 hCG 40h 后的小鼠颈部脱臼处死，无菌条件下迅速取下左右两侧得输卵管，在解剖镜下用尖头镊子将输卵管撕碎，收集到的 2 细胞胚胎在 mFHM 液中洗 3 遍后即可进行早期培养。

1.2.6 胚胎培养

接种到 96 孔板的子宫上皮细胞培养 2 天后，细胞单层开始形成，细胞已经长至培养孔面积的 80%。在进行培养前 2h 弃去培养基，用含 0.4%BSA 的无酚红 mKSOM 培养基润洗细胞两次，加入新鲜 mKSOM 或不同浓度 17β-雌二醇 mKSOM 培养基。同时在没有上皮细胞单层的培养孔中也同样加入新鲜 mKSOM 或不同浓度 17β-雌二醇 mKSOM 培养基，将培养板置于 CO<sub>2</sub> 培养箱培养预热 2h。胚胎共培养时，将获取得 2 细胞胚胎随机放入各个培养孔中，每孔放入 20~30 个胚胎。在 37℃，5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。每隔 36h，每个培养孔更换相应的新鲜培养基。每日取出培养板用倒置显微镜观察胚胎的发育情况，并记录拍照。

1.2.7 囊胚期胚胎细胞染色计数（见第三章）

1.2.8 RT-PCR 检测胚胎 ERα mRNA 的表达

1.2.8.1 不同发育时期小鼠胚胎的收集

在注射 hCG20h 后，处死合笼后有栓的雌鼠，取 1 细胞的小鼠胚胎，部分直接收集，其余在体外继续培养。分别在体外培养 24h、36h、48h、72h、96h 后选取不同时期形态好的胚胎，用含 0.5%BSA 的无钙镁 PBS 液洗涤胚胎两次后，收集于 5μl 的细胞裂解液中，每个样品含 30~35 枚相同时期的胚胎。样品快速置入液氮，然后置于-80℃ 的超低温冰箱冷冻保存。

1.2.8.2 cDNA 模板的合成

- (1) 反应前取出样品，置于冰上使之解冻融解。加入 1.0μl 的 Oligo(dT)<sub>15</sub>，70℃ 水浴 5min；
- (2) 反应结束后，冰上放置 3min。加入 18.0μl 反转录成分，在该体系中加入 1.0μl M-MLV 反转录酶，对照管中不加 M-MLV 反转录酶。混匀，42℃ 水浴反应 60min。反转录产物保存于-20℃ 备用或立即 PCR 扩增。

反转录成分：

RT buffer (5×)	5.0μl
dNTP	2.0μl
RNAsin	1.0μl
灭菌的 DEPC 水	10.0μl
Total	18.0μl

1.2.8.3 cDNA 的扩增

(1) 引物设计

ER $\alpha$  引物: 总长度为 478bp

Sense: 5'>GGAGATTCTGATGATTGGTCT<3'

Antisense: 5'>CATCTCCAGGAGCAGGTCAT<3'

$\beta$ -actin 引物: 总长度为 569bp

Sense: 5'>ATGAGGTAGTCTGTCAGGT<3'

Antisense: 5'>ATGGATGACGATATCGCT<3'

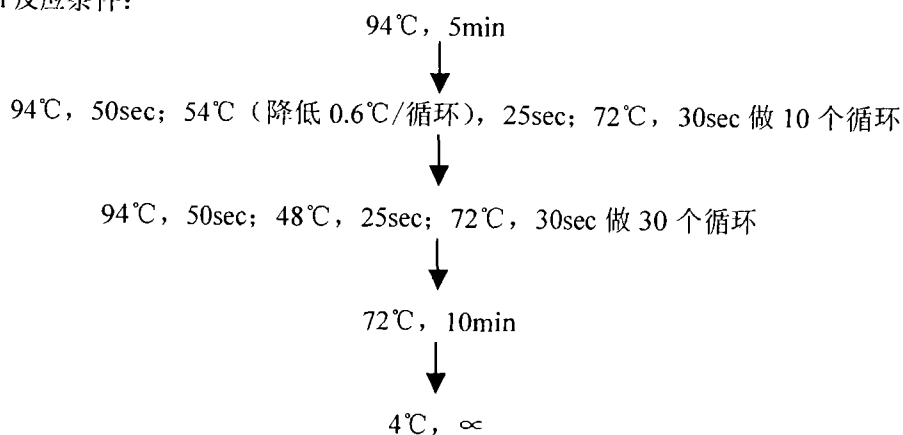
(2) 反应体系

在 0.25ml 的离心管中分别加入以下组分:

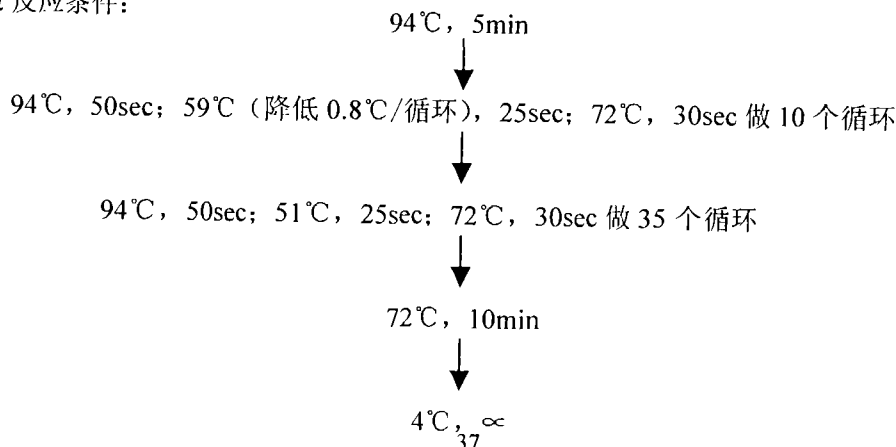
H <sub>2</sub> O	11.5 $\mu$ l
dNTP	3.0 $\mu$ l
PCR buffer (10 $\times$ )	2.5 $\mu$ l
Primer 1/Primer 2	1.0 $\mu$ l/1.0 $\mu$ l
Tag Polymerase	1.0 $\mu$ l
cDNA 模板	5.0 $\mu$ l
Total	25.0 $\mu$ l

(3) 反应条件

$\beta$ -actin 反应条件:



ER $\alpha$  反应条件:



#### 1.2.8.4 琼脂糖凝胶电泳

琼脂糖凝胶的浓度为 0.8%，电压为 80V，电流为 100mA，每孔上样量为 6 $\mu$ l。

#### 1.2.9 胚胎的免疫细胞化学染色

- (1) 收集不同发育阶段的新鲜胚胎，预冷 PBS 中洗 3 遍，每遍 5min；
- (2) 胚胎转移至经 APES 处理过的载玻片，室温下干燥 5~10min；
- (3) 4%的多聚甲醛，室温下湿盒内固定 30min；
- (4) 固定好的胚胎依次经过 30%、50%、70%、95%和 100%的酒精脱水，每一个梯度放 3~5min；
- (5) 胚胎脱水后置入-80℃，冷冻过夜；
- (6) 冷冻 48h 后取出胚胎，室温下解冻；
- (7) 依次通过 100%、95%、70%、50%和 30%的梯度酒精水化；
- (8) 含 0.2% Triton X-100 的 PBS 穿孔 20min；
- (9) 封闭液（0.2% Triton X-100、10%正常羊血清的 PBS）中室温下湿盒内封闭 2h；
- (10) 将 ER $\alpha$  一抗用 TBS 按 1:100 稀释，分别加在载玻片上，在 4℃下孵育过夜；
- (11) 用 0.01M 的 pH 值为 7.4 的 PBS 洗 3 次，每次 5min；
- (12) 用 PBS 对 GAM-B 作 300 倍稀释，加在切片上并在常温下孵育 2h，然后用 PBS 按上述方法进行洗涤；
- (13) 用 PBS 对 SP-HRP 作 300 倍稀释，加在切片上在常温下孵育 2h，再用上述方法进行洗涤；
- (14) 用 0.05M 的 TB 配制 0.5mg/ml 的 DAB，并按每毫升 DAB 溶液加入 2 $\mu$ l 的 30%的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。配制好显色液加在玻片上显色 1~5min，自来水终止显色；
- (15) 用 Hoechst33342 染色液复染 5min，50%的甘油封片后镜检拍照。
- (16) 对照组用封闭液替代单克隆 ER $\alpha$  的抗体，其它染色步骤于同上。

#### 1.2.10 结果统计

每个实验组重复 4~6 次，用 SigmaPlot 进行实验数据处理。数据用平均数  $\pm$  标准差 (M  $\pm$  SEM) 表示，采用 t 检验比较组间差异显著性， $P < 0.05$  为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 小鼠胚胎 ER $\alpha$ mRNA 的表达

参考 Daniels 等人报道的方法 (Daniels *et al.*, 1997)，收集不同发育时期的小鼠胚胎，提取 RNA 进行 RT-PCR。实验结果如图 5-1 (A) 所示，植入前不同时期小鼠胚胎都有 ER $\alpha$  mRNA 的表达。以持家基因  $\beta$ -actin 为内参，ER $\alpha$  mRNA 在不同时期胚胎中表达的相对水平如图 5-1 (B)

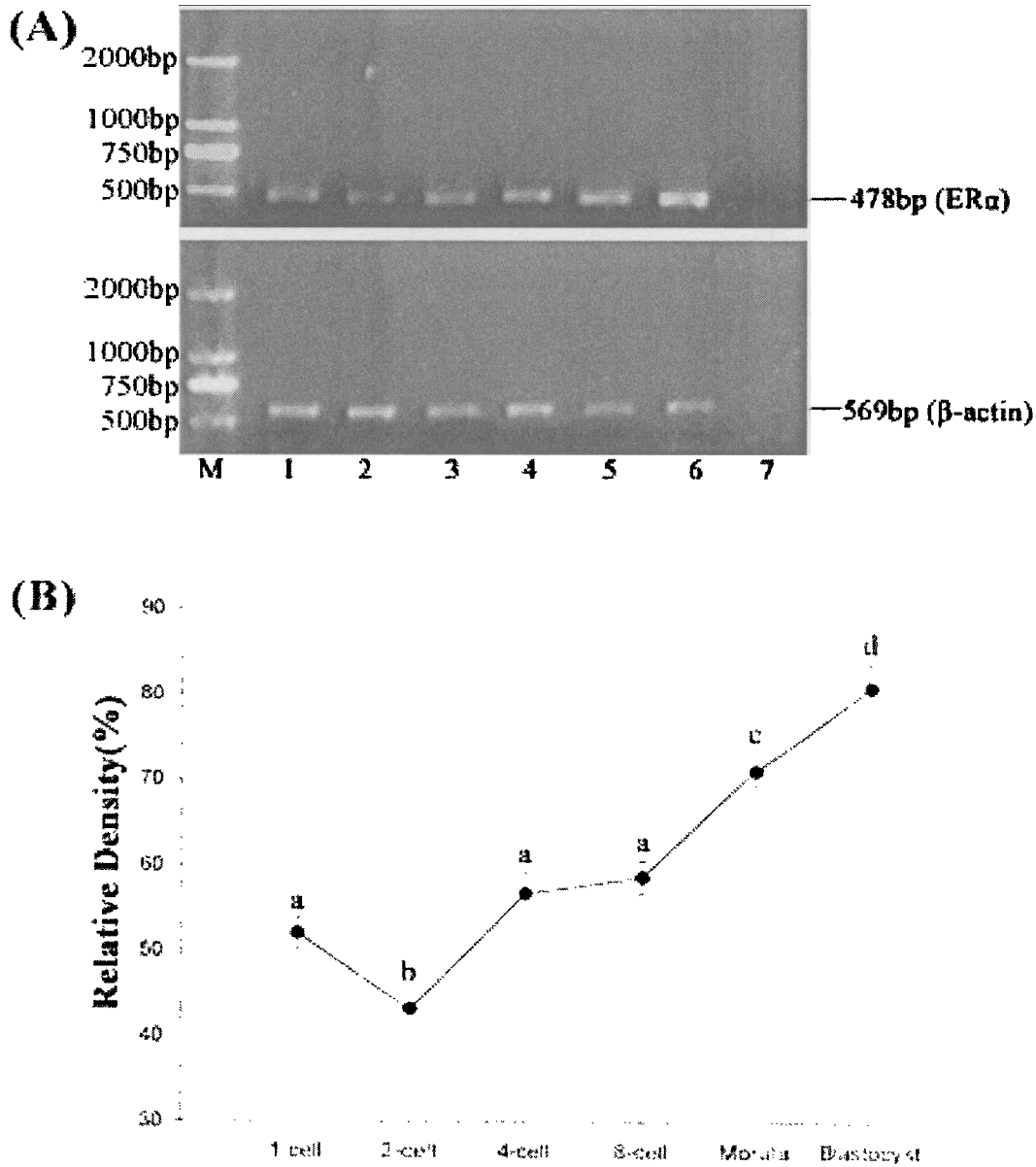


图 5-1 早期小鼠胚胎 ERα mRNA 的表达。(A) 早期小鼠胚胎总 RNA 扩增 ERα 和 β-actin 后电泳结果。图中标注 M、1、2、3、4、5、6、7 分别为 DNA Maker、1 细胞、2 细胞、4 细胞、8 细胞、桑椹胚、囊胚期胚胎 mRNA 反转录扩增后电泳结果，7 为囊胚期胚胎在反转录过程中不加反转录酶进行扩增作为阴性对照。(B) ERα mRNA 在早期小鼠胚胎中表达的相对水平，纵坐标为 ERα 与 β-actin 电泳结果密度扫描比值 (%)。a、b、c、d 不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Fig.5-1 Expression of ERα mRNAs in early mouse embryos. (A) Agarose-gel electrophoresis of PCR product amplified with primers ERα and β-actin from early mouse embryos. Lanes are M, DNA marker; 1, 1-cell embryos; 2, 2-cell embryos; 3, 4-cell embryos; 4, 8-cell embryos; 5, morulae; 6, blastocysts; 7, negative control of blastocysts (no M-MLV reverse transcriptase addition during reverse transcription). (B) The relative level(%) for ERα in early mouse embryos was determined as the ratio of ERα/β-actin measured by densitometry. a, b, c, d, different letters denote significant different ratios ( $P < 0.05$ ).

所示，2 细胞期 ER $\alpha$  mRNA 表达水平明显低于 1 细胞期 ( $P<0.05$ )。4 细胞时期 ER $\alpha$  mRNA 表达开始回升，并在囊胚期 ER $\alpha$  mRNA 表达水平达到最大值。

## 2.2 ER $\alpha$ 蛋白在早期小鼠胚胎的表达

收集体外发育不同阶段的小鼠胚胎，根据 Miodrag 等人报道的方法对胚胎进行免疫染色处理 (Stojkovic *et al.*, 2003)。不同发育阶段小鼠胚胎 ER $\alpha$  免疫染色结果如图 5-2。结果表明，在 2 细胞和 4 细胞期的小鼠胚胎没有 ER $\alpha$  蛋白的表达 (图 5-2-A、5-2-B 和 5-2-C、5-2-D)，8 细胞期的胚胎开始有较弱的 ER $\alpha$  蛋白的表达，表现为胚胎细胞核所在区域呈很弱的棕黄色 (图 5-2-E、5-2-F)，而与之相应的对照组确没有阳性结果 (图 5-2-G、5-2-H)。随着胚胎的继续发育，ER $\alpha$  的表达会不断增强，表现为细胞核棕黄色颜色加深。囊胚期的小鼠胚胎细胞已经分化为两种不同的细胞类型，但 ER $\alpha$  阳性细胞均匀分布于整个的胚胎，ER $\alpha$  并没有出现细胞类型特异性分布 (图 5-2-M、5-2-N)。

表 5-1 17 $\beta$ -雌二醇在单一培养体系中对小鼠胚胎体外发育的影响

Tab.5-1 Effect of 17 $\beta$ -Estradiol on the early development of mouse embryo in mKSOM medium

17 $\beta$ -雌 二醇 (pg/ml)	2 细胞 胚胎数 n	4 细胞 百分数 (M $\pm$ SEM)%	桑椹胚 百分数 (M $\pm$ SEM)%	囊 胚 百分数 (M $\pm$ SEM)%	总细胞数 (M $\pm$ SEM)(n)	孵化囊胚 百分数 (M $\pm$ SEM)%
0(对照)	126	(89.7 $\pm$ 2.5) <sup>a</sup>	(64 $\pm$ 5.3) <sup>b</sup>	(48.9 $\pm$ 4.3) <sup>c</sup>	(30.7 $\pm$ 3.4) <sup>d</sup> (17)	(18.9 $\pm$ 5.3) <sup>e</sup>
20	138	(90.2 $\pm$ 1.6) <sup>a</sup>	(68 $\pm$ 4.8) <sup>b</sup>	(47.4 $\pm$ 2.8) <sup>c</sup>	(32.4 $\pm$ 2.3) <sup>d</sup> (19)	(21.4 $\pm$ 4.1) <sup>e</sup>
50	110	(93.4 $\pm$ 1.7) <sup>a</sup>	(72 $\pm$ 5.6) <sup>b</sup>	(53.6 $\pm$ 4.2) <sup>c</sup>	(32.9 $\pm$ 2.7) <sup>d</sup> (21)	(24.2 $\pm$ 3.4) <sup>e</sup>
100	109	(92.3 $\pm$ 2.1) <sup>a</sup>	(73 $\pm$ 6.1) <sup>b</sup>	(53.2 $\pm$ 5.1) <sup>c</sup>	(35.4 $\pm$ 3.2) <sup>d</sup> (16)	(25.1 $\pm$ 5.0) <sup>e</sup>
500	113	(94.3 $\pm$ 2.4) <sup>a</sup>	(76 $\pm$ 5.6) <sup>b</sup>	(55.4 $\pm$ 6.3) <sup>c</sup>	(34.1 $\pm$ 4.3) <sup>d</sup> (14)	(19.8 $\pm$ 4.7) <sup>e</sup>
1000	103	(91.5 $\pm$ 1.9) <sup>a</sup>	(67 $\pm$ 5.2) <sup>b</sup>	(56.3 $\pm$ 6.9) <sup>c</sup>	(31.2 $\pm$ 3.3) <sup>d</sup> (17)	(23.5 $\pm$ 4.4) <sup>e</sup>

同一列内不同的字母之间比较有显著差异， $P<0.05$

Columns marked with different letters have difference ( $P<0.05$ )

## 2.3 雌激素对早期胚胎体外发育的影响

不同生理剂量的 17 $\beta$ -雌二醇对小鼠胚胎发育的结果如表 5-1 和表 5-2。结果表明，不论是在小鼠子宫上皮细胞共培养体系中，还是在单一养体系中不同生理剂量的 17 $\beta$ -雌二醇对桑椹胚以前的胚胎卵裂率没有显著的影响。而在胚胎与子宫上皮细胞共培养体系中，50pg/ml 的 17 $\beta$ -雌二醇可以显著提高囊胚发育率和囊胚的孵化率 ( $P<0.05$ )，同时囊胚期胚胎的总细胞数也会明显增加 ( $P<0.05$ )。而在单一养体系中，不同生理剂量的 17 $\beta$ -雌二醇对囊胚发育率、孵化率以及囊胚期胚胎总细胞数都没有显著的影响。

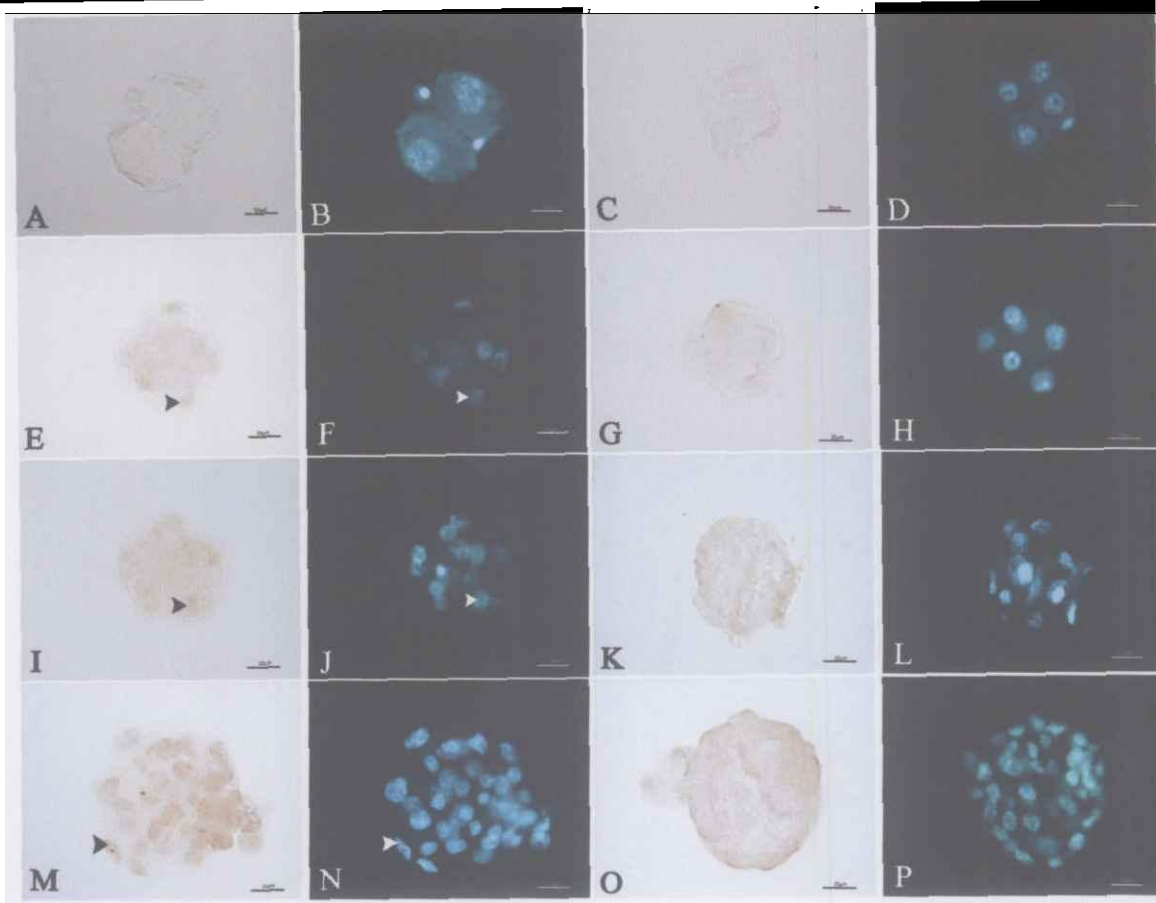


图 5-2 小鼠胚胎 ER $\alpha$  的免疫染色结果

A、C、E、I、M分别为1细胞、4细胞、8细胞、桑椹胚、囊胚期胚胎ER $\alpha$ 免疫染色结果；B、D、F、J、N分别为A、C、E、I、M组采用Hoechst 33342对细胞核进行荧光染色的结果；G、K、O分别为8细胞、桑椹胚、囊胚期胚胎免疫染色的阴性对照；H、L、P分别为G、K、O组采用Hoechst 33342对细胞核进行荧光复染结果。图中标尺为20 $\mu$ m。

Fig.5-2 The results of immunostaining with ER $\alpha$  in early mouse embryos

A, C, E, I and M are the results of immunostaining with ER $\alpha$  in 2-cell embryos, 4-cell embryos, 8-cell embryos, morulae and blastocysts; B, D, F, J and N are the results of Hoechst 33342 nuclear staining of A, C, E, I and M. G, K and O are negative control of 8-cell embryos, morulae and blastocysts; H, L and P are the results of Hoechst 33342 nuclear staining of G, K and O. The scale bars are 20 $\mu$ m.

表 5-2 17 $\beta$ -雌二醇在共培养体系对小鼠胚胎体外发育的影响

Tab.5-2 Effect of 17 $\beta$ -Estradiol on the early development of mouse embryos in co-culture system

17 $\beta$ -雌二醇	2 细胞	4 细胞	桑椹胚	囊 胚	孵化囊胚
	胚胎数	百分数	百分数	百分数	总细胞数 百分数
(pg/ml)	n	(M $\pm$ SEM)%	(M $\pm$ SEM)%	(M $\pm$ SEM)%	(N $\pm$ SEM)(n) (M $\pm$ SEM)%
0(对照)	113	(91.6 $\pm$ 2.1) <sup>a</sup>	(66.3 $\pm$ 6.9) <sup>b</sup>	(48.5 $\pm$ 3.8) <sup>c</sup>	(48.4 $\pm$ 3.5) <sup>d</sup> (25) (23.9 $\pm$ 2.3) <sup>e</sup>



20	104	(93.6±2.3) <sup>a</sup>	(73.3±7.9) <sup>b</sup>	(51.7±4.8) <sup>c</sup>	(51.3±2.1) <sup>d</sup> (23)	(28.7±2.9) <sup>e</sup>
50	121	(95.8±2.2) <sup>a</sup>	(84.2±5.3) <sup>b</sup>	(62.4±3.6) <sup>d</sup>	(64.0±3.3) <sup>e</sup> (31)	(46.9±3.4) <sup>f</sup>
100	97	(94.7±1.7) <sup>a</sup>	(85.8±5.3) <sup>b</sup>	(58.6±4.0) <sup>c</sup>	(58.6±3.4) <sup>d</sup> (19)	(40.2±4.9) <sup>e</sup>
500	103	(96.3±2.4) <sup>a</sup>	(82.9±4.9) <sup>b</sup>	(54.8±5.2) <sup>c</sup>	(57.3±3.2) <sup>d</sup> (21)	(31.2±4.6) <sup>e</sup>
1000	93	(96.5±1.2) <sup>a</sup>	(77.7±3.8) <sup>b</sup>	(54.3±5.7) <sup>c</sup>	(55.9±2.4) <sup>d</sup> (23)	(26.5±4.9) <sup>e</sup>

同一列内不同的字母之间比较有显著差异,  $P < 0.05$

Columns marked with different letters have difference ( $P < 0.05$ )

### 3 讨论

在本实验中, 我们采用 RT-PCR 和免疫细胞化学方法检测了小鼠胚胎 ER $\alpha$  表达。结果表明不同时期的小鼠均有 ER $\alpha$  mRNA 的表达, 2 细胞时期表达量降低, 在随后的胚胎发育过程中, ER $\alpha$  mRNA 的表达量逐渐增加, 并在囊胚期的表达量达到最大值。免疫细胞化学结果表明, 8 细胞时期开始有 ER $\alpha$  蛋白的表达。此外我们的体外培养实验表明, 虽然早期胚胎就开始有 ER $\alpha$  的表达, 但在单一培养体系中添加不同生理剂量的 17 $\beta$ -雌二醇不会影响到小鼠胚胎的发育, 只有在小鼠子宫上皮细胞共培养体系中 17 $\beta$ -雌二醇的添加才会影响到小鼠胚胎体外发育。这表明雌激素对早期胚胎发育的调控对子宫上皮细胞有一定的依赖性。

雌激素必须通过其受体才能起作用, 为了进一步认识雌激素对早期胚胎发育的调控, 人们首先需要弄清早期胚胎 ER 的表达情况。Wu 等人在 1992 年首次发现 ER $\alpha$  mRNA 存在于小鼠的卵母细胞和 2 细胞时期的胚胎 (Wu *et al.*, 1992)。Hou 等人随后发现 ER $\alpha$  mRNA 不仅存在于小鼠卵母细胞、受精卵和 2 细胞胚胎, 而且还发现 ER $\alpha$  mRNA 水平从 2 细胞时期开始下降, 在 5 细胞到 8 细胞时期表达量最低。桑椹胚时期没有其表达, 但是在囊胚期又会重新有 ER $\alpha$  mRNA 的表达 (Hou *et al.*, 1992)。我们的实验表明, 不同时期的小鼠胚胎均存在 ER $\alpha$  mRNA 的表达。而且在 2 细胞时期其表达量最低, 在随后的胚胎发育过程中其表达水平会不断升高。因此我们推测, 这一差异可能由于采用不同小鼠品系的所至, 也可能是由于我们采用不同 RNA 提取方法的原因 (Daniels *et al.*, 1997)。

此外免疫细胞化学方法结果表明, 8 细胞期小鼠胚胎已经开始有 ER $\alpha$  蛋白的表达。Hou 等人 1996 年首次采用免疫细胞化学的方法, 首次验证了囊胚期的小鼠胚胎已经存在 ER $\alpha$  蛋白的表达, 而且这种 ER $\alpha$  的表达没有细胞特异性分布 (Hou *et al.*, 1996), 我们的结果与此一致。由于免疫细胞化学方法的敏感度仍然有一定局限性, 所以我们还不能断定 8 细胞期以前的小鼠胚胎不存在 ER $\alpha$  蛋白的表达。但通过我们的研究, 可以确定囊胚期以前的小鼠胚胎就开始有 ER $\alpha$  蛋白的表达, 这进一步表明雌激素可能直接参与小鼠早期胚胎发育调控。

为了认识 ER $\alpha$  在早期胚胎发育过程中的作用, 我们进行了胚胎体外培养实验。实验结果表明, 单一培养体系中不同生理剂量的 17 $\beta$ -雌二醇均不会影响到小鼠早期胚胎发育。Lavranos 等人的研究表明, 小鼠的子宫内膜细胞对小鼠胚胎的体外发育有促进作用, 雌激素可以进一步协同子宫内膜细胞对胚胎发育的这种促进作用 (Lavranos *et al.*, 1989)。为此, 我们的研究中还

采用小鼠子宫上皮细胞与胚胎共培养体系。在胚胎的体细胞共培养体系中,不同剂量的 17 $\beta$ -雌二醇对囊胚期以前的胚胎卵裂率没有显著影响,但 50pg/ml 的 17 $\beta$ -雌二醇会对囊胚率、孵化率以及囊胚期胚胎的总细胞数产生显著影响。这一结果表明,虽然早期的小鼠胚胎就有 ER $\alpha$  的表达,但雌激素对胚胎发育的调控需要子宫上皮细胞的参与。对此我们推测:尽管早期的小鼠胚胎就开始有 ER $\alpha$  的表达,但是这种表达量仍然很弱不足以引起雌激素的直接作用,所以雌激素对胚胎的作用需要子宫上皮细胞分泌的某种成份,这种分泌成份可能依赖于雌激素也可能不依赖于雌激素。此外,这些分泌成份可能直接作用于胚胎,也可能协同雌激素对雌激素受体的作用 (Stefan *et al.*, 2001)。因为有证据表明妊娠早期的子宫上皮细胞已经开始有 ER 的表达 (Wu *et al.*, 1971), 雌激素可以引起子宫上皮细胞分泌成份的变化 (David *et al.*, 1999; Robertson *et al.*, 1996)。

Ying 等人还发现早期的猪胚胎和子宫组织也存在 ER $\alpha$  蛋白的表达 (Ying *et al.*, 2000)。Xia 等人对猪胚胎进行研究,结果表明雌激素处理的输卵管上皮细胞可以显著提高胚胎的卵裂率 (Xia *et al.*, 1996)。然而 Goff 等人在对牛的胚胎进行相应实验是却没有得到相应的结果 (Goff *et al.*, 1998), 究竟是什么原因并不清楚,因为到目前为止牛的胚胎是否也同样存在 ER 的表达还不知道。

本研究结果表明,ER $\alpha$  在早期的小鼠胚胎开始表达,然而雌激素对早期胚胎发育的调节需要上皮细胞的参与。但是雌激素如何和子宫上皮细胞来作用于早期胚胎的发育有待于进一步的研究。

## 第六章 结 论

1. mKSOM 是一种简单、高效的昆明小鼠胚胎体外培养体系；采用 B6D2F1 小鼠精子进行体外受精，其体外受精率、囊胚率和囊胚总细胞数显著高于 KM 小鼠的精子。
2. 胚胎共培养明显促进了体外受精后小鼠胚胎的卵裂、孵化，同时囊胚总细胞数也有显著提高。
3. 植入前不同发育时期小鼠胚胎均有 ER $\alpha$  mRNA 表达，其表达水平在 2 细胞时期降低到最低，并在囊胚期达到最大；8 细胞期的小鼠胚胎开始有 ER $\alpha$  蛋白的表达。
4. 子宫上皮细胞共养体系中，50pg/ml 的 17 $\beta$ -雌二醇能够促进小鼠胚胎的卵裂、孵化，同时囊胚期总细胞数也有明显的提高。这提示，雌激素对早期胚胎发育的调控可能需要子宫上皮细胞的参与。

## 参 考 文 献

- Adachi K, Kurachi H, Adachi H, *et al.* Menstrual cycle specific expression of epidermal growth factor receptors in human fallopian tube epithelium. *J Endocrinol*, 1995, 147: 553-563.
- Baltes P, Sanchez R, Pena P, *et al.* Evidence for the synthesis and secretion of a CBG-like serpin by human cumulus oophorus and fallopian tubes. *Andrologia*, 1998, 30: 249-253.
- Bavister BD. Co-culture for embryo development: is it really necessary? *Hum Reprod*, 1992, 7: 1339-1341.
- Bavister BD. Culture of preimplantation embryos: fact and artefact. *Hum Reprod Update*, 1995, 1: 91-148.
- Bavister BD. Role of oviductal secretions in embryonic growth in vivo and in vitro. *Theriogenology*, 1988, 29: 143-145.
- Biggers JD, Gwatkin RB, Brinster RL. Development of mouse embryos in organ cultures of fallopian tubes on a chemically defined medium. *Nature*, 1962, 194: 747-749.
- Biggers JD. Reflections on the culture of the preimplantation embryo. *Int J Dev Biol*, 1998, 42(7): 879-884.
- Bolton VN, Wren ME, Parsons JH, *et al.* Pregnancies after in vitro fertilization and transfer of human blastocysts. *Fertil Steril*. 1991, 55(4): 830-832.
- Bongso A, Fong CY, Ng SC, *et al.* The search for improved in-vitro systems should not be ignored: embryo co-culture may be one of them. *Hum Reprod*, 1993, 8: 1155-1160.
- Bongso A, Ng SC, Fong CY, *et al.* Improved pregnancy rate after transfer of embryos grown in human fallopian tubal cell coculture. *Fertil Steril*, 1992, 58: 569-574.
- Bongso A, Soon-Chye N, Sathananthan H, *et al.* Improved quality of human embryos when co-cultured with human ampullary cells. *Hum Reprod*, 1989, 4: 706-713.
- Brison DR, Leese HJ. Energy metabolism in late preimplantation rat embryos. *J Reprod Fertil*, 1991, 93(1): 245-251.
- Buhi WC, Alvarez IM, Kouba AJ. Secreted proteins of the oviduct. *Cells Tissues Organs*, 2000, 166: 165-179.
- Buhi WC, Ashworth CJ, Bazer FW, *et al.* In vitro synthesis of oviductal secretory proteins by estrogen-treated ovariectomized gilts. *J Exp Zool*, 1992, 262: 426-435.
- Buhi WC, Bazer FW, Alvarez IM, *et al.* In vitro synthesis of oviductal proteins associated with estrus and 17 beta-estradiol-treated ovariectomized ewes. *Endocrinology*, 1991, 128: 3086-3095.
- Cai LQ, Cao YJ, Duan EK. Effects of leukaemia inhibitory factor on embryo implantation in the mouse. *Cytokine*, 2000, 12(11):1676-1682.
- Carlos S, Amparo M, Juan GV, George N, *et al.* Coculture of Human Embryos with Autologous Human Endometrial Epithelial Cells in Patients with Implantation Failure. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999, 84: 2638-2646.

- Carlsson B, Hillensjo T, Nilsson A, Tornell J, Billig H. Expression of IGF-I in the rat fallopian tube: possible autocrine and paracrine action of fallopian tube-derived IGF-I on the fallopian tube and on the preimplantation embryo. *Endocrinology*, 1993, 133: 203-219.
- Carnegie JA, Morgan JJ, McDiarmid N, *et al.* Influence of protein supplements on the secretion of leukaemia inhibitory factor by mitomycin-pretreated Vero cells: possible application to the in vitro production of bovine blastocysts with high cryotolerance. *J Reprod Fertil*, 1999, 117: 41-48.
- Casan EM, Raga F, Bonilla-Musoles F, Polan ML. Human oviductal gonadotropin-releasing hormone: possible implications in fertilization, early embryonic development, and implantation. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000, 85: 1377-1381.
- Casañ EM, Raga F, Kruessel JS, Wen Y, Nezhat C, Polan ML. Immunoreactive gonadotropin-releasing hormone expression in cycling human endometrium of fertile patients. *Fertil Steril*, 1998, 70: 102-106.
- Casan EM, Raga F, Polan ML. GnRH mRNA and protein expression in human preimplantation embryos. *Mol Hum Reprod*, 1999, 5: 234-239.
- Chang MC. Fertilization of rabbit ova in vitro. *Nature*, 1959, 184: 466-467.
- Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD, *et al.* An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. *J Reprod Fert*, 1989, 86: 679-688.
- Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD, *et al.* Development of one-cell embryos from different strains of mice in CZB medium. *Biol Reprod*, 1990, 42: 432-440.
- Chegini N, Rong H, Dou Q, *et al.* Gonadotropin releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor gene expression in human myometrium and leiomyomata and the direct action of GnRH analogs on myometrial smooth muscle cells and interaction with ovarian steroids in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996, 81: 3215-3221.
- Comer MT, Leese HJ, Southgate J. Induction of a differentiated ciliated cell phenotype in primary cultures of Fallopian tube epithelium. *Hum Reprod*, 1998, 13: 3114-3120.
- Comizzoli P, Marquant-Le Guienne B, Heyman Y, Renard JP. Onset of the first S-phase is determined by apaternal effect during the G1-phase in bovine zygotes. *Biol Reprod*, 2000, 62: 1677-1684.
- Conaghan J, Handyside AH, Winston RM, *et al.* Effects of pyruvate and glucose on the development of human preimplantation embryos in vitro. *J Reprod Fertil*, 1993, 99: 87-95.
- Conn PM, Crowley Jr WF. Gonadotropin releasing hormone and its analogues. *N Engl J Med*, 1991, 324: 93-103.
- Daniels R, Lowell S, Bolton V, Monk M. Transcription of tissue-specific genes in human preimplantation embryos. *Hum Reprod*. 1997, 12: 2251-2256.
- David A, Serr DM, Czernobilsky B. Chemical composition of human oviduct fluid. *Fertil Steril*, 1973, 24: 435-439.
- David LB, Tommy S, Dennis BL, *et al.* Tissue compartment-specific estrogen receptor- $\alpha$  participation in the mouse uterine epithelial secretory response. *Endocrinology*, 1999, 140(1):

- 484-491.
- Davidson MB. Effect of growth hormone on carbohydrate and lipid metabolism. *Endocr Rev*, 1987, 8: 115-131.
- Denny S, Yvonne D, Gail P, *et al.* Use of the egg-share model to investigate the paternal influence on fertilization and embryo development after in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*, 2004, 82: 74-79.
- Desai NN, Kennard EA, Kniss DA, Friedman CI. Novel human endometrial cell line promotes blastocyst development. *Fertil Steril*, 1994, 61(4): 760-766.
- Devreker F, Vanden BM, Biramane J, *et al.* Effects of taurine on human embryo development in vitro. *Hum Reprod*, 1999, 14: 2350-2356.
- Dumoulin JCM, Evers JLH, Bakker JA, *et al.* Temporal effects of taurine on mouse preimplantation development in vitro. *Hum Reprod*, 1992, 7: 403-407.
- Dunglison GF, Kaye PL. Insulin regulates protein metabolism in mouse blastocysts. *Mol Reprod Dev*, 1993, 36: 42-48.
- Eggan K, Akutsu H, Loring J, *et al.* Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation. *PNAS*, 2001, 98: 6209-6214.
- embryogenesis. *Mol Reprod Dev*, 1992, 33(4):407-412.
- Emons G, Schroder B, Ortmann O, Westphalen S, Schulz K, Schally AV. High affinity binding and direct antiproliferative effects of luteinizing hormone releasing hormone analogs in human endometrial cancer lines. *J Clin Endocrinol Metab*, 1993, 77: 1458-1464.
- Eppig JJ, Ward-Bailey PF and Coleman DL. Hypoxanthine and adenosine in murine ovarian follicular fluid: concentrations and activity in maintaining oocyte meiotic arrest. *Biol Reprod*, 1985, 33: 1041-1049.
- Fabbri R, Porcu E, Marsella T, *et al.* Human embryo development and pregnancies in an homologous granulosa cell coculture system. *J Assist Reprod Genet*, 2000, 17: 1-12.
- Fissore R, O'Keefe S and Kiessling AA. Purine-induced block to mouse embryo cleavage is reversed by compounds that elevate cyclic adenosine monophosphate. *Biol Reprod*, 1992, 47: 1105-1112.
- Francisco R, Eva MC, Jan K, *et al.* The role of gonadotropin-releasing hormone in murine preimplantation embryonic development. *Endocrinology*, 1999, 140(8): 3602-3608.
- Funston RN, Seidel GE. Gonadotropin-releasing hormone increases cleavage rates of bovine oocytes fertilized in vitro. *Biol Reprod*, 1995, 53: 541-545.
- Gardner DK, Lane M, Calderon I, *et al.* Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. *Fertil Steril*, 1996, 65: 349-353.
- Gardner DK, Lane M, Spitzer A, *et al.* Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage in vitro in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins and culturing embryos in groups stimulate development. *Biol Reprod*, 1994, 50: 390-400.

- Gardner DK, Leese HJ. Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism in vitro. *J Reprod Fertil*, 1990, 88: 361-368.
- Gardner DK, Schoolcraft WB, Wagley L, *et al.* A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization. *Hum Reprod*, 1998, 13(12): 3434-3440.
- Gardner DK. Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. *Theriogenology*, 1998, 49: 83-102.
- George GJM, Eva E, Markku PH, *et al.* Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *PNAS*, 1996, 93: 5925-5930.
- Gharib SD, Wiermann ME, Shupnik MA, *et al.* Molecular biology of pituitary gonadotrophins. *Endocr Rev*, 1990, 11: 177-199.
- Gluckman PD, Grumbach MM, Kaplan SL.. The neuroendocrine regulation and function of growth hormone and prolactin in the mammalian fetus. *Endocr Rev*, 1981, 2: 363-395.
- Goddard MJ, Pratt HP. Control of events during early cleavage of the mouse embryo: An analysis of the "2-cell block". *J Embryol Exp Morphol*, 1983, 73: 111-133.
- Goff AK, Smith LC. Effect of steroid treatment of endometrial cells on blastocyst development during co-culture. *Theriogenology*, 1998, 49(5):1021-1030.
- Goto K, Iwai N, Takuma Y, Nakanishi Y. Co-culture of in vitro fertilized bovine embryos with different cell monolayers. *Anim Sci*, 1992, 70:1449-1453.
- Gregory TE, JA Lawitts, Virginia EP, *et al.* Differential growth of the mouse preimplantation embryo in chemically defined media. *Biol Reprod*, 1994, 50: 1027-1033.
- Harrer JA and Lee HH. Differential effects of oestrogen on the uptake of nucleic acid precursors by mouse blastocysts in vitro. *J Reprod Fertil*, 1973, 33: 327-330.
- Harvey MB, Arcellana-Panlilio MY, Zhang X, *et al.* Expression of genes encoding antioxidant enzymes in preimplantation mouse and cow embryos and primary bovine oviduct cultures employed for embryo coculture. *Biol Reprod*, 1995, 53(3):532-540.
- Hearn JP, Gidley-Baird AA, Hodges JK, *et al.* Embryonic signals during the peri-implantation period in primates. *J Reprod Fertil*, 1988, 36: 49-58.
- Hemmings R, Langlais J, Falcone T, *et al.* Human embryos produce transforming growth factor alpha activity and insulin-like growth factor II. *Fertil Steril*, 1992, 58:101-104.
- Hill JA. Maternalembryonic cross-talk. *Ann N Y Acad Sci*, 2001, 943: 17-25.
- Hiroi H, Momoeda M, Inoue S, *et al.* Stage-specific expression of estrogen receptor subtypes and estrogen responsive finger protein in preimplantational mouse embryos. *Endocr J*, 1999, 46(1): 153-158.
- Hisahiko H, Mikio M, Satoshi I, *et al.* Stage-specific expression of estrogen receptorsubtypes and estrogen responsive finger protein in preimplantation mouse embryo. *Endocrine Journal*, 1999, 46(1):153-158.
- Hofker MH, Deursen JV. *Transgenic Mouse Methods and Protocols* .2002, Humana Press.

- Hou Q and Gorski J. Estrogen receptor and progesterone receptor genes are expressed differentially in mouse embryos during preimplantation development. *PNAS*, 1993, 90: 9460-9464.
- Hou Q, Gorski J. Estrogen receptor and progesterone receptor genes are expressed differentially in mouse embryos during preimplantation development. *Proc Natl Acad Sci*, 1993, 90:9460-9464.
- Hou Q, Paria BC, Cecily M, Dey SK, and Gorski J. Immunolocalization of estrogen receptor protein in the mouse blastocyst during normal and delayed implantation. *PNAS*, 1996, 93: 2376-2381.
- Hou Q, Paria BC, Mui C, *et al.* Immunolocalization of estrogen receptor protein in the mouse blastocyst during normal and delayed implantation. *PNAS*, 1996, 93(6): 2376-2381.
- Hunter RH. Modulation of gamete and embryonic microenvironments by oviduct glycoproteins. *Mol Reprod Dev*, 1994, 39: 176-181.
- Iwashita M, Kudo Y, Shinozaki Y, Takeda Y. Gonadotropinreleasing hormone increases serum human chorionic gonadotropin in pregnant women. *Endocr J*, 1993, 40: 539-544.
- Jayot S, Parneix I, Verdaguer S, Discamps G, Audebert A, Emperaire JC. Coculture of embryos on homologous endometrial cells in patients with repeated failures of implantation. *Fertil Steril*, 1995, 63(1): 109-114.
- Jin HY, Wang ZN. Insulin-like growth factors and their receptors in human fallopian tube in reproductive-age women. *Fertil Steril*, 2001, 75: 1037-1038.
- Jones GM. Growth and viability of human blastocysts in vitro. *Reprod Med Rev*, 2000, 8(3): 241-287.
- 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: 193-199.
- Kane MT, Morgan PM, Coonan C. Peptide growth factors and preimplantation development. *Hum Reprod Update*, 1997, 3: 137-157.
- Kaye PL, Harvey MB. The role of growth factors in preimplantation development. *Prog Growth Factor Res*, 1995, 6: 1-24.
- Kidson A, Rubio-Pomar FJ, Van Knegsel A, *et al.* Quality of porcine blastocysts produced in vitro in the presence or absence of GH. *Reproduction*, 2004, 127(2): 165-177.
- Kolle S, Stojkovic M, Reese S, *et al.* Effects of growth hormone on the ultrastructure of bovine preimplantation embryos. *Cell Tissue Res*, 2004, 317(1): 101-108.
- Kurachi H, Morishige K, Imai T, *et al.* Expression of epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha in fallopian tube epithelium and their role in embryogenesis. *Horm Res*, 1994, 41: 48-54.
- Lai YM, Wang HS, Lee CL, *et al.* Insulin-like growth factor-binding proteins produced by Vero cells, human oviductal cells and human endometrial cells, and the role of insulin-like growth factor binding protein-3 in mouse embryo co-culture systems. *Hum Reprod*, 1996, 11: 1281-1286.
- Lane M, Gardner DK. Amino acids and vitamins prevent culture-induced metabolic perturbations and associated loss of viability of mouse blastocysts. *Hum Reprod*, 1998, 13(4): 991-997.
- Lavranos TC, Seamark RF. Addition of steroids to embryo-uterine monolayer co-culture enhances embryo survival and implantation in vitro. *Reprod Fertil Dev*, 1989, 1:41-46.



- Lawitts JA and Biggers JD. Optimization of mouse embryo culture media using simplex methods. *J Reprod Fertil*, 1991, 91: 543-556.
- Lawitts JA, Biggers JD. Optimization of mouse embryo culture media using simplex methods. *J Reprod Fertil*, 1991, 91: 543-556.
- Lee KF, Chow JF, Xu JS, *et al.* A comparative study of gene expression in murine embryos developed in vivo, cultured in vitro, and cocultured with human oviductal cells using messenger ribonucleic acid differential display. *Biol Reprod*, 2001, 64: 910-917.
- Leese HJ, Conaghan J, Martin KL, *et al.* Early human embryo metabolism. *Bioessays*, 1993, 15: 259-264.
- Leese HJ, Tay JJ, Reischl J, *et al.* Formation of Fallopian tubal fluid: role of a neglected epithelium. *Reproduction*, 2001, 121: 339-346.
- Leese HJ. Metabolic control during preimplantation mammalian development. *Hum Reprod Update*, 1995, 1: 63-72.
- Leese HJ. The formation and function of oviduct fluid. *J Reprod Fertil*, 1988, 82: 843-856.
- Li YP, Cheng GX, Gu Z, Zuo JK. Co-culture of rat one-cell embryos with rabbit oviduct epithelial cells. *Chinese Journal of Acta Biologiae Experimentalis Sinica*, 1993, 26: 339-340.
- Lighten AD, Moore GE, Winston RM, *et al.* Routine addition of human insulin-like growth factor-I ligand could benefit clinical in-vitro fertilization culture. *Hum Reprod*, 1998, 13: 3144-3150.
- Lippes J, Enders RG, Pragay DA, *et al.* The collection and analysis of human fallopian tubal fluid. *Contraception*, 1972, 5: 85-103.
- Lippes J, Krasner J, Alfonso LA, *et al.* Human oviductal fluid proteins. *Fertil Steril*, 1981, 36: 623-629.
- Liu LP, Chan ST, Ho PC, *et al.* Human oviductal cells produce high molecular weight factor(s) that improves the development of mouse embryo. *Hum Reprod*, 1995, 10: 2781-2786.
- Liu LP, Chan ST, Ho PC, *et al.* Partial purification of embryotrophic factors from human oviductal cells. *Hum Reprod*, 1998, 13: 1613-1619.
- Lobie PE, Wood TJ, Chen CM, Waters MJ, Norstedt G. Nuclear translocation and anchorage of the GH receptor. *J Biol Chem*, 1994, 269: 31735-31746.
- Loutradis D, John D and Kiessling AA. Hypoxanthine causes a 2-cell block in random-bred mouse embryos *Biol Reprod*, 1987, 37:311-316.
- Ma WG, Song H, Das SK, *et al.* Estrogen is a critical determinant that specifies the duration of the window of uterine receptivity for implantation. *PNAS*, 2003, 100 (5): 2165-3004.
- Maas DH, Storey BT, Mastroianni LJ. Hydrogen ion and carbon dioxide content of the oviductal fluid of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Fertil Steril*, 1977, 28: 981-985.
- Martin KL. Nutritional and metabolic requirements of early cleavage stage embryos and blastocysts. *Hum Fertil*. 2000, 3(4): 247-254.
- Martin L and Finn CA. Hormonal regulation of cell division in epithelial and connective tissues of the mouse uterus. *J Endocrinol*, 1968, 41: 363-371.
- Matthews CJ, Redfern CP, Hirst BH, Thomas EJ. Characterization of human purified epithelial and

- stromal cells from endometrium and endometriosis in tissue culture. *Fertil Steril*, 1992, 57(5): 990-997.
- Mccormack JT, Greenwald GS. Progesterone and oestradiol-17 $\beta$  concentrations in the Peripheral plasma during pregnancy in the mouse. *J Endocrinol*, 1974, 62: 101-107.
- McRae AC. Effects of the anti-progestin and anti-glucocorticoid steroid RU486 on cell proliferation in oviductal embryos of lactating mice. *J Reprod Fertil*, 1994, 100: 307-313.
- Menezo Y, Guerin P. The mammalian oviduct: biochemistry and physiology. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1997, 73: 99-104.
- Mercader A, Garcia VJ, Escudero E, *et al.* Clinical experience and perinatal outcome of blastocyst transfer after coculture of human embryos with human endometrial epithelial cells: a 5-year follow-up study. *Fertil Steril*. 2003, 80(5): 1162-1168.
- Mishra S, Lei ZM, and Rao CV. A Novel Role of Luteinizing Hormone in the Embryo Development in Cocultures. *Biol Reprod*, 2003, 68: 1455-1462.
- Morales P. Gonadotropin-releasing hormone increases ability of the spermatozoa to bind to the human zona pellucida. *Biol Reprod*, 1998, 59: 426-430.
- Morishige K, Kurachi H, Amemiya K, *et al.* Menstrual stage-specific expression of growth factor and transforming growth factor-alpha in human oviduct epithelium and their role in early embryogenesis. *Endocrinology*, 1993, 133: 199-207.
- Nichol R, Hunter RH, Gardner DK, *et al.* Concentrations of energy substrates in oviductal fluid and blood plasma of pigs during the peri-ovulatory period. *J Reprod Fertil*, 1992, 96: 699-707.
- Nieder GL, Weitlauf HM, Suda-Hartman M. Synthesis and secretion of stage-specific proteins by peri-implantation mouse embryos. *Biol Reprod*, 1987, 36(3): 687-699.
- Nurreddin A, Epsaro E and Kiessling AA. Purines inhibit the development of mouse embryos in vitro. *J Reprod Fertil*, 1990, 90: 455-464.
- O'DayBowman MB, Mavrogianis PA, Reuter LM, *et al.* Association of oviduct-specific glycoproteins with human and baboon (*Papio anubis*) ovarian oocytes and enhancement of human sperm binding to human hemizonae following in vitro incubation. *Biol Reprod*, 1996, 54: 60-69.
- Olivennes F, Hazout A, Lelaidier C, *et al.* Four indications for embryo transfer at the blastocyst stage. *Hum Reprod*, 1994, 9: 2367-2673.
- Ouhibi N, Hamidi J, Guillaud J, *et al.* Co-culture of 1-cell mouse embryos on different cell supports. *Hum Reprod*, 1990, 5: 737-743.
- Paech K, Webb P, Kuiper GG, *et al.* Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science*, 1997, 277(5331): 1508-1510.
- Pantaleon M, Whiteside EJ, Harvey MB, *et al.* Functional growth hormone (GH) receptors and GH are expressed by preimplantation mouse embryos: a role for GH in early embryogenesis? *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 5125-5130.
- Paria BC, Huet-Hudson YM, Dey SK. Blastocyst's state of activity determines the "window" of implantation in the receptive mouse uterus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 10159-10162.
- Patsoula E, Loutradis D, Drakakis P, *et al.* Expression of mRNA for the LH and FSH receptors in

- mouse oocytes and preimplantation embryos. *Reproduction*, 2001, 121(3): 455-461.
- Patsoula E, Loutradis D, Drakakis P, Kallianidis K, Bletsas R, and Michalas S. Expression of mRNA for the LH and FSH receptors in mouse oocytes and preimplantation embryos *Reproduction*, 2001, 121: 455-461.
- Patton PE, Sadler-Fredd K, Burry KA, *et al.* Development and integration of an extended embryo culture program. *Fertil Steril*. 1999, 72(3): 418-422.
- Paul P, Jacqueline T, Sumathy S, Coombes RC, Simak A. Human Estrogen Receptor Beta Binds DNA in a Manner Similar to and Dimerizes with Estrogen Receptor Alpha. *J Biol Chem*, 1997, 272: 25832-25838.
- Petraglia F, Lim AT, Vale W. Adenosine 39,59-monophosphate, prostaglandins, and epinephrine stimulate the secretion of immunoreactive gonadotropin-releasing hormone from cultured human placental cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 1987, 65: 1020-1025.
- Petraglia F, Micheroux AA, Florio P, *et al.* Steroid-protein interaction in human placenta. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1995, 53: 227-231.
- Pfeifer TL, Chegini N. Immunohistochemical localization of insulin-like growth factor (IGF-I), IGF-I receptor, and IGF binding proteins 14 in human fallopian tube at various reproductive stages. *Biol Reprod*, 1994, 50: 281-289.
- Pollow K, Inthraphuvasak J, Grill HJ, Manz B. Estradiol and progesterone binding components in the cytosol of normal human fallopian tubes. *J Steroid Biochem*, 1982, 16: 429-435.
- Raga F, Casañ EM, Kruessel JS, Wen Y, Huang HY, Nezhat C, Polan ML. Quantitative gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene expression and immunohistochemical localization in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Biol Reprod*, 1998, 59: 661-669.
- Rehman N, Collins AR, Suh TK, *et al.* Development of IVM-IVF produced 8-cell bovine embryos in simple, serum-free media after conditioning or co-culture with buffalo rat liver cells. *Mol Reprod Dev*, 1994, 38: 251-255.
- Rider V, Heap RB, Wang MY, Feinstein A. Anti-progesterone monoclonal antibody affects early cleavage and implantation in the mouse by mechanisms that are influenced by genotype. *J Reprod Fertil*, 1987, 79: 33-43.
- Robertson SA, Mayrhofer G and Seamark RF. Ovarian steroid hormones regulate granulocyte-macrophage colony-stimulating factor synthesis by uterine epithelial cells in the mouse. *Biol Reprod*, 1996, 54(1): 183-196.
- Sabine K, Miodrag S, Katja P, *et al.* Growth hormone (GH)/GH receptor expression and GH-mediated effects during early bovine embryogenesis. *Biol Reprod*, 2001, 64(6): 1826-1834.
- Segaloff DL, Ascoli M. The lutropin/choriogonadotropin receptor 4 years later. *Endocr Rev*, 1993, 14: 324-342.
- Sengupta J, Roy SK, and Manchanda SK. Effect of an oestrogen synthesis inhibitor, 1,4,6,-androstatriene-3,17-dione, on mouse embryo development in vitro. *J Reprod Fertil*, 1982, 66: 63-66.

- Seshagiri PB, Terasawa E, Hearn JP. The secretion of gonadotrophin-releasing hormone by peri-implantation embryos of the rhesus monkey: comparison with the secretion of chorionic gonadotrophin. *Hum Reprod*, 1994, 9: 1300-1307.
- Smith DM and Smith AE. Uptake and incorporation of amino acids by cultured mouse embryos: estrogen stimulation. *Biol Reprod*, 1971, 4: 66-73.
- Smotrich DB, Stillman RJ, Widra EA, *et al.* Immunocytochemical localization of growth factors and their receptors in human pre-embryos and Fallopian tubes. *Hum Reprod*, 1996, 11: 184-190.
- Steeves TE, Gardner DK. Temporal and differential effects of amino acids on bovine embryo development in culture. *Biol Reprod*, 1999, 61: 731-740.
- Stefan N, Sarima K, Eckardt T, *et al.* Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev*, 2001, 81(4):1535-1565.
- Stojkovic M, Krebs O, Kölle S, *et al.* Developmental regulation of hyaluronan-binding protein (RHAMM/IHABP) expression in early bovine embryos. *Biol Reprod*, 2003, 68(1): 60-66.
- Summers MC, Bhatnagar PR, Lawitts FA, *et al.* Fertilization in vitro of mouse ova from inbred and outbred preimplantation embryo development in glucose-supplemented KSOM. *Biol Reprod*, 1995, 53: 431-437.
- Summers MC, McGinnis LK, Lawitts FA, *et al.* IVF of mouse ova in a simplex optimized medium supplemented with amino acids. *Hum Reprod*, 2000, 15: 1791-1801.
- Summers PM, Taylor CT, Miller MW. Requirement of inner cell mass for efficient chorionic gonadotrophin secretion by blastocyst of common marmosets (*Callithrix jacchus*). *J Reprod Fertil*, 1993, 97: 321-327.
- Sun T, Lei ZM, Rao CV. A novel regulation of the oviductal glycoprotein gene expression by luteinizing hormone in bovine tubal epithelial cells. *Mol Cell Endocrinol*, 1997, 131: 97-108.
- Tan J, Paria BC, Dey SK, *et al.* Differential uterine expression of estrogen and progesterone receptors correlates with uterine preparation for implantation and decidualization in the mouse. *Endocrinology*, 1999, 140(11): 5310-5321.
- Terada Y, Fukaya T, Takahashi M, Yajima A. Expression of growth hormone receptor in mouse preimplantation embryos. *Mol Hum Reprod*, 1996, 2: 879-881.
- Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LE. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J Reprod Fertil*, 1972, 30: 493-497.
- Toledo AA, Wright G, Jones AE, *et al.* Blastocyst transfer: a useful tool for reduction of high-order multiple gestations in a human assisted reproduction program. *Am J Obstet Gynecol*. 2000, 183:377-379.
- Tucker MJ, Ingargiola PE, Massey JB, *et al.* Assisted hatching with or without bovine oviductal epithelial cell co-culture for poor prognosis in-vitro fertilization patients. *Hum Reprod*, 1994, 9: 1528-1531.
- Vlad M, Walker D, Kennedy RC. Nuclei number in human embryos co-cultured with human ampullary cells. *Hum Reprod*, 1996, 11: 1678-1686.

- Walker SK, Hill JL, Kleemann DO, Nancarrow CD. Development of ovine embryos in synthetic oviductal fluid containing amino acids at oviductal fluid concentrations. *Biol Reprod*, 1996, 55: 703-708.
- Walter I. Culture of bovine oviduct epithelial cells (BOEC). *Anat Rec*, 1995, 243: 347-356.
- Wang P, Lei ZM, Rao CV. Cyclic AMP/protein kinase A signaling in luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin action to increase the oviductal glycoprotein synthesis in bovine tubal epithelial cells. *Biol Reprod* 1998, 58 (suppl 1): 114.
- Ward F, Rizos D, Corridan D, Quinn K, Boland M, Lonergan P. Paternal influence on the time of first embryonic cleavage postinsemination and the implications for subsequent bovine embryo development in vitro and fertility in vivo. *Mol Reprod Dev*, 2001, 60: 47-55.
- Wegner CC, Carson DD. Mouse uterine stromal cells secrete a 30-kilodalton protein in response to coculture with uterine epithelial cells. *Endocrinology*, 1992, 131(6): 2565-2572.
- Whittingham DG, Biggers JD. Fallopian tube and early cleavage in the mouse embryo. *Nature*, 1967, 213: 942-943.
- Wiemer KE, Cohen J, Tucker MJ, *et al.* The application of co-culture in assisted reproduction: 10 years of experience with human embryos. *Hum Reprod*, 1998, 13: 226-238.
- Wiemer KE, Garrisi J, Steuerwald N, *et al.* Beneficial aspects of co-culture with assisted hatching when applied to multiple-failure in-vitro fertilization patients. *Hum Reprod*, 1996, 11: 2429-2433.
- Wiemer KE, Hu Y, Cuervo M, *et al.* The combination of coculture and selective assisted hatching: results from their clinical application. *Fertil Steril*, 1994, 61: 105-110.
- Wilson M, Hartke K, Kiehl M, *et al.* Transfer of blastocysts and morulae on day 5. *Fertil Steril*. 2004, 82(2): 327-333.
- Wu JT, Dickmann Z and Johnson DC. Effects of oestrogen and progesterone on the development, oviductal transport and uterine retention of eggs in hypophysectomized pregnant rats. *J Endocrinol*, 1971, 51: 569-574.
- Wu TC, Wang L, Wan YJ. Expression of estrogen receptor gene in mouse oocyte and during embryogenesis. *Mol Reprod Dev*, 1992, 33(4): 407-412.
- Xia P, Rutledge J, Watson AJ. Effect of estrogen-treated porcine ampulla oviductal epithelial cells on early embryonic development in vitro and characterization of their protein synthetic activity. *Anim Reprod Sci*, 1996, 45:217-229.
- Xu J, Cheung TM, Chan ST, *et al.* Human oviductal cells reduce the incidence of apoptosis in cultured mouse embryos. *Fertil Steril*, 2000, 74: 1215-1219.
- Yang BC, Uemura T, Minaguchi H. Effects of a Gonadotropin releasing hormone agonist on oocyte maturation, fertilization, and embryonal development in mice. *J Assit Reprod Genet*, 1995, 12: 728-732.
- Yang YQ, Wu JT. RU 486 interferes with egg transport and retards the in vivo and in vitro development of mouse embryos. *Contraception*, 1990, 41: 551-556.

- Yeung WS, Ho PC, Lau EY, *et al.* Improved development of human embryos in vitro by a human oviductal cell co-culture system. *Hum Reprod*, 1992, 7: 1144-1149.
- Yeung WS, Lau EY, Chan ST, *et al.* Coculture with homologous oviductal cells improved the implantation of human embryos a prospective randomized control trial. *J Assist Reprod Genet*, 1996, 13: 762-767.
- Yeung WSB, Lee CKF, Xu JS. The Oviduct and Development of the Preimplantation Embryo. *Reprod Med Rev*, 2002, 10: 21-44.
- Ying CW, Hsu WL, Hong WF. Estrogen receptor is expressed in pig preimplantation development. *Mol Reprod Dev*, 2000, 55: 83-88.
- Yovich JL. Embryo quality and pregnancy rates in vitro fertilization. *Lancet*, 1985:283-284.
- Yoshinaga K, Adams CE. Delayed implantation in the spayed, progesterone treated adult mouse. *J Reprod Fertil*, 1966, 12(3): 593-595.
- 陈大元. 受精生物学—受精机制与生殖工程. 科学出版社. 2000.
- 刘莹, 武迪迪, 宗志宏等. 昆明系小鼠体外受精方法及一种新培养基的应用. *中国医科大学学报*, 1999, 28: 8-10.
- 庞也非, 李东, 旭日干. 昆明小鼠卵子体外受精及其新培养系统的建立. *汕头大学医学院院报*, 1995, 1: 17-21.
- 汪凡, 黄文起, 窦云凌等. 罗比卡因和利多卡因对小鼠体外受精和早期胚胎发育的影响. *生殖医学杂志*, 2002, 4: 218-221.
- 王敏康, 刘冀珑, 李光鹏. M16 添加牛磺酸和 EDTA 支持昆明白小鼠体外受精并发育至囊胚. *遗传*, 2000, 5: 301-302.
- 王敏康, 张田, 王晓燕等. 几种克服昆明小鼠 2-细胞胚胎发育阻滞培养液的研究. *动物学报*, 2000, 46: 81-87.
- 乌日琴, 邓新燕, 陈颖青. 影响小鼠卵母细胞体外成熟和体外受精效果的因素分析. *畜牧与兽医*, 2001, 1: 16-17.
- 严云勤, 李光鹏, 郑小民. 发育生物学原理与胚胎工程. 黑龙江科学技术出版社. 1995.
- 尹海林, 陈秀兰. 小鼠卵母细胞体外培养成熟及“试管小鼠”的研究. *遗传*, 1989, 11: 18-22.
- 张嘉保, 任文陟, 宋德光. 小鼠体外受精、胚胎培养及胚胎快速冷冻的研究. *草食家畜*, 2001, S2: 144-149.
- 张守全, 王羽中, 江青艳等. 明小鼠早期胚胎 G6PDH 在 CZB 和 KSOM 中的转录与表达. *中国兽医学报*, 2002, 22: 359-362.

## 附录 试剂配方及配制方法

表 1 培养液配方

成分 Component	分子量 Molecular weigh	mKSOM (mg/100ml)	mFHM (mg/100ml)	CZB (mg/100ml)	HTF (mg/100ml)
NaCl	58.45	559.5	559.5	477.0	593.8
KCl	74.56	18.5	18.5	36.0	35.0
MgSO <sub>4</sub>	120.45	2.4	2.4	14.2	2.4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136.10	4.8	4.8	16.1	5.0
60%乳酸钠 (Sodium lactate)	112.10	174 μl	174 μl	585 μl	342 μl
NaHCO <sub>3</sub>	84.02	210.1	34.9	211.1	210.0
丙酮酸钠 (Sodium pyruvate)	110.00	2.2	2.2	3.0	3.7
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	147.20	25.2	25.2	25.0	30.0
HEPES	238.30	—	496.9	—	—
EDTA·Na <sub>2</sub>	372.20	0.4	0.4	4.1	—
葡萄糖 (Glucose)	198.17	110.2	110.2	110.2/—	50.0
青霉素 (Penicillin)		6.0	6.0	6.0	7.5
链霉素 (Streptomycin)		5.0	5.0	5.0	5.0
谷氨酰胺 (Glutamine)	146.15	14.6	14.6	14.6	—
BSA (Bovine serum albumin)		400.0	400.0	500.0	400.0
酚红 (Phenol red)		0.1	0.1	0.1	0.1

表 2 储存液的配制

储存液 Stock	成分 Component	mKSOM (g/100ml)	CZB (g/100ml)	HTF (g/100ml)
Stock A (10×)	NaCl	5.595	4.77	5.938
	KCl	0.185	0.36	0.3496
	MgSO <sub>4</sub>	0.0241	0.142	0.0241
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.0475	0.161	0.0504
	60%乳酸钠 (Sodium lactate)	1.74 ml	5.85 ml	3.42 ml
	葡萄糖 (Glucose)	1.102	1.102/—	0.50
	青霉素 (Penicillin)	0.06	0.06	0.075
	链霉素 (Streptomycin)	0.05	0.05	0.050
	Stock B (10×)	NaHCO <sub>3</sub>	2.101	2.111
酚红 (Phenol red)		0.001	0.001	0.001
Stock C (100×)	丙酮酸钠 (Sodium pyruvate)	0.0360 g/10ml	0.0360 g/10ml	0.0360 g/10ml
Stock D (100×)	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.2521 g/10ml	0.2521 g/10ml	0.2521 g/10ml
Stock E (100×) (pH 7.4)	HEPES	1.4895 g/25ml	1.4895 g/25ml	1.4895 g/25ml
	酚红 (Phenol red)	0.001	0.001	0.001
EDTA Stock (100×)	EDTA	0.0372 g/10ml	0.0372 g/10ml	0.0372 g/10ml
Glutamine Stock (100×)	Glutamine	0.2920 g/10ml	0.2920 g/10ml	0.2920 g/10ml

所有储存液过滤除菌，分装后-20℃保存 2~3 个月。



表 3 10ml 工作液的配制

Stock	mKSOM (ml)	mFHM (ml)	CZB (ml)	HTF (ml)
Stock A (10×)	1	1	1	1
Stock B (10×)	1	0.2	1	1
Stock C (100×)	0.061	0.061	0.084	0.101
Stock D (100×)	0.100	0.100	0.100	0.119
Stock E (100×)	—	0.800	—	—
EDTA Stock (100×)	0.010	0.010	0.110	—
Glutamine Stock (100×)	0.050	0.050	0.050	—
H <sub>2</sub> O	7.779	7.779	7.656	7.780
BSA	0.04 g	0.04 g	0.05 g	0.04 g

调 pH 至 7.2~7.4，过滤除菌，4℃保存 1~2 周。

## 致 谢

本论文是在导师崔胜教授的悉心指导下完成的，他严谨的治学态度、精辟的见解、敏锐的思维和对自己严格要求的工作作风，是我终身学习的榜样。在他的言传身教和谆谆教导下，使我真正懂得了作为一个科研工作者应具备的素质，和对自己所从事工作的认真踏实敬业的态度，这将对我今后的人生之路产生巨大的影响。在毕业之际，谨向导师致以崇高的敬意和诚挚的谢意。

此外夏国良教授、苟克勉副教授还给予我大量的指导和帮助，他们渊博的学识、精辟的观点，和宽广的胸襟都给我留下了深刻的印象。感谢生理系郑行老师、乔惠理老师、候健老师、邵育静老师和周波老师在学业上所给予的无私指导和帮助。同时，生物学院的康舵老师、狄秀英老师、洪海燕老师和冯丽华老师也给了我很多帮助，在此一并表示感谢。

在实验室工作的过程中，始终能够感受到融洽的气氛，更能体会到集体的温暖和智慧。在这里我由衷地感谢给我过欢乐和帮助的每一位同学，他们是刘佳利、沈红、田兴贵、何玉琴、李建华、尚江华、钟友刚、刘忠霞、罗昊澍、张小平、陈大为、袁学军、张金华、王国新、刘树强、陈红平、胡格、杨剑英、孙德昊、杜申、范晶晶、吴英杰、卜淑敏、谢辉蓉、雷蕾、陈秀芬、陶勇、王凤超、张美佳、付茂勇、王超、王松波、杨建鸽、宁刚、沈月、宋小明、金世英、付卓、许宝山、欧阳宏、张华等。国家重点实验室的严阿勇、李明、黄晓萌、梅志强、雷霆华、喻雅静等同学在实验中给予我很大的帮助，在此表示衷心的感谢！

最后特别要感谢我的家人三年来无私的关怀和支持，使我顺利完成学业！

陈悦洲

2005年6月