

硕士学位
论文

不同培养液成分及培养系统对水牛
体外受精早期胚胎发育的影响

叶丹娜

廣西大學

二〇〇六年六月

分类号_____

UDC _____

硕士学位论文

不同培养液成分及培养系统对水牛 体外受精早期胚胎发育的影响

叶 丹 娜

学科专业 动物遗传育种与繁殖

指导教师 卢克焕 教授

论文答辩日期 2006.6.10 学位授予日期 _____

答辩委员会主席 石德顺 研究员

论文评阅人 黄右军 研究员 梁贤威 副研究员

不同培养液成分及培养系统对水牛体外 受精早期胚胎发育的影响

摘要

本试验研究的主要内容是探讨不同的添加物及培养系统对水牛早期胚胎体外发育的影响,通过这些影响胚胎体外发育的重要因素的研究,确定合适的添加浓度,为不断改善牛早期胚胎培养液组分及培养系统提供科学的依据。抽取来自屠宰场水牛卵巢表面直径为2~6 mm 卵泡的卵母细胞,在体外成熟培养后与水牛精子进行体外受精(IVF),受精后18 h 将假定受精的卵子移入添加有不同成分的培养系统进行培养,受精后2 d 检查分裂率,5~9 d 检查囊胚发育率;所得囊胚分别进行冷冻,观察其解冻后囊胚的孵化能力;用Hoechst33342进行染色,检查其细胞数;进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),进行胚胎蛋白质组分差异分析。结果发现:1)在TCM-199培养液中添加的胰岛素浓度为5 μ g/mL时,水牛早期胚胎的囊胚发育率,囊胚细胞数及冷冻—解冻后胚胎的孵化率都显著高于对照组及其他浓度组($P < 0.05$);2)不管在受精后18 h还是96 h在TCM-199培养液中加入葡萄糖,当浓度大于6 mM时显著影响水牛早期胚胎发育到囊胚及孵化囊胚的阶段($P < 0.05$);3)在TCM-199培养液中联合添加胰岛素和葡萄糖时能显著提高水牛早期胚胎的孵化囊胚率、总囊胚率和囊胚细胞数($P < 0.05$),且对胚胎蛋白质组表达没有影响;4)受精后在TCM-199培养液中加入非必需氨基酸和96 h后添加必需氨基酸能显著提高水牛胚胎的发育能力($P < 0.05$),不影响胚胎蛋白质组分的表达;5)在TCM-199培养液中添加肌醇及柠檬酸钠对水牛胚胎的发育无显著差异($P > 0.05$),对胚胎蛋白质组分的表达没有影响;6)水牛胚胎分别在以颗粒细胞和输卵管上皮细胞为共培养系统中培养时,其囊胚发育率,囊胚细胞数及冷冻—解冻后胚

胎的孵化率没有显著影响($P>0.05$), 胚胎蛋白质组分的表达没有差异; 7) 水牛胚胎在以TCM-199为基础液的培养系统中培养时, 其总囊胚率, 囊胚细胞数及冷冻—解冻后胚胎的孵化率都显著高于以SOFaa为基础培养液的培养系统($P<0.05$), 胚胎蛋白质组分的表达没有差异。以上结果表明: 1) 浓度为5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的胰岛素能促进水牛体外受精早期胚胎的发育; 2) 在TCM-199中单独添加葡萄糖是不必要的, 联合添加葡萄糖和胰岛素能促进水牛体外受精早期胚胎的发育; 3) 受精后加入非必需氨基酸及96 h后加入必需氨基酸能促进水牛早期胚胎的发育; 4) 添加肌醇和柠檬酸钠对水牛体外受精早期胚胎发育没有影响; 5) 以TCM-199为基础液的共培养系统是水牛胚胎最佳的培养体系。

关键词: 水牛 体外受精 早期胚胎 培养系统 培养液成分

EFFECTS OF DIFFERENT CULTURE MEDIUM COMPOSITIONS AND CULTURE SYSTEMS ON BUFFALO EMBRYO DEVELOPMENT IN VITRO

ABSTRACT

The objective of the present study is to assess the effect of different culture systems and culture medium compositions on in vitro early embryo development in buffalo and, based on this study, to subsequently optimise the culture system for a better in vitro early embryo development in buffalo.

Oocytes were aspirated from 2 ~ 6 mm follicles on the ovaries from slaughterhouse and matured in vitro. After maturation, oocytes were fertilized with buffalo sperm. 18h after insemination, the presumptive zygotes were transfer to culture medium supplemented with different compositions. Cleavage and blastocyst rates were recorded on D2 and D5~D9 after insemination, respectively. Cells of each blastocyst were counted with fluorescent microscope after staining with Hoechst33342. Hatching of embryos post frozen-thawed were assessed. Analysis of different protein expression in embryos was carried out with SDS-PAGE electrophoresis.

The results showed that: i) The cleavage rate, blastocyst rate, cell numbers of blastocyst and the hatching rate post frozen-thawed were significantly higher than other groups ($P < 0.05$), when the concentration of insulin in the culture medium was 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; ii) There was a negative effect on early embryo development and the hatching rate, when the supplementation of glucose was higher than 6 mM in the embryo culture medium at 18 h or 96 h after insemination; iii) A combination of supplementations with insulin and glucose in the culture medium could significantly increase the blastocyst development rate, cell numbers in blastocyst and hatching rate ($P < 0.05$); iv) Both supplementations of EAA at 10 h and NEAA at 96 h in the culture medium after insemination could increase the developmental potential ($P < 0.05$); v) Supplementation of sodium citrate and myo-inositol had no significant effect on the buffalo embryo development as comparing the controls ($P > 0.05$). vi) The cell

number of blastocyst and hatching rate did not significantly differ from control group, when the buffalo early embryos were co-cultured with cumulus cells and oviduct epithelial cells; vii) while the blastocyst development rate, cell number in blastocyst and hatching rate was higher in culture system based on TCM-199 than that based on SOFaa. There was no significant difference in the protein expression among all the treatments.

KEY WORDS: buffalo; in vitro fertilization; early embryos; culture systems

目 录

中文摘要	I
英文摘要	III
目录	V
第一章 哺乳动物体外受精早期胚胎培养及相关问题研究进展 (综述部分)	2
第一节 前言	3
第二节 哺乳动物体外受精的研究	3
第三节 哺乳动物早期胚胎体外培养的生物学原理与研究进展	4
第四节 哺乳动物胚胎的质量评价	17
第五节 小结与展望	19
第二章 不同培养系统及培养液成分对水牛体外受精早期胚胎体外发育的影响 (试验部分)	21
第一节 前言	21
第二节 材料与方法	21
第三节 试验结果	28
第四节 分析与讨论	39
第五节 结论	44
参考文献	45
附录	54
图片与说明	55
致谢	57
攻读硕士学位期间发表的学术论文	58

第一章

哺乳动物体外受精早期胚胎培养及 相关问题研究进展 (综述部分)

第一章 哺乳动物体外受精早期胚胎培养及 相关问题研究进展

第一节 前言

体外受精 (in vitro fertilization, IVF) 是指在体外环境完成精卵结合的过程。它包括卵子的成熟培养、精子获能、受精和胚胎早期培养等几个连续过程。一百多年前就有人开始进行了哺乳动物人工授精和体外受精的尝试,但一直进展不大^[1]。直到 20 世纪 50 年代,美籍华人张明觉和 Austin 首次在兔卵体外受精中获得成功,才使得体外受精技术有了质的飞跃。它的发展和成熟不仅为研究动物配子的成熟、受精机理和早期胚胎发育控制等带来方便,同时也为现代生物工程技术,如:细胞核移植、胚胎早期性别鉴定、转基因等提供丰富的实验材料和基本技术保证,是实现动物生产工厂化,解决动物胚胎来源的有效途径^[2]。

自 1959 年张明觉首先把体外受精的兔受精卵移植给受体母兔获得世界上第一个“试管哺乳动物”以来,体外受精技术逐步完善,已相继在 30 余种哺乳动物上获得成功^[3]。近些年来,研究者在改良培养液、培养条件、提高胚胎体外生产效率方面做了大量工作,其主要目的在于:①尽量模拟体内受精和发育环境,提高胚胎体外生产效率;②通过在培养体系中添加化学物质以图更好地了解整个受精过程中的生理机制。但是目前体外胚胎生产技术的累积效率却很低,卵母细胞体外成熟 (In vitro maturation, IVM) 及受精后发育至桑椹胚和囊胚的比例仅有 30%-40%^[4]。因而体外受精技术一方面具有广阔的发展和应用前景,另一方面仍有许多悬而未决的问题需进一步研究。

第二节 哺乳动物体外受精的研究现状

早在 1878 年, 德国科学家 Schenk 就在家兔及豚鼠上进行体外受精的尝试。他将家兔和豚鼠排卵前的卵母细胞和附睾内精子放入子宫内进行孵育, 观察到第二极体释放和卵裂现象^[5]。1951 年张明觉和澳大利亚的 Austin 发现了哺乳动物精子获能现象, 这是体外受精史上的一个里程碑^[6]。1954 年, 家兔体外受精获得了成功^[7], 并于 1959 年获得世界上首例“试管动物”——试管兔^[8], 为哺乳动物体外受精工程奠定了基础。同一时期, 法国的 Thibault 研究组提供了充足的兔卵子体外受精形态学证据, 哺乳动物体外受精技术开始为世人所公认。1963 年, 金黄仓鼠体外受精获得成功^[9], 1968 年, 小鼠体外受精成功并产仔^[10], 1970 年和 1972 年, 分别获得猫^[11]、豚鼠^[12]体外受精的成功。得益于 Chang、Austin 和 Yanagimachi 等学者的开创性研究, 各种哺乳动物体外受精包括中国仓鼠^[13]、砂鼠^[14]、岩石猴^[15]、大鼠^[16]、狗^[17]、滋贺鼠^[18]、恒河鼠^[19]、猕猴^[20]、黑猩猩^[21]等相继在不同的试验室获得成功。

在人上, Edward 等在 1969 年最早报道了体外受精的研究^[13]。1978 年, 第一例试管婴儿在英国诞生^[22], 这是体外受精技术走向全面应用的标准事件, 是医学和生物学上一次伟大的革命^[22]。体外受精技术因此也为不育家庭带来了福音。

在家畜上, 用于体外受精研究最早的动物是绵羊。1959 年, Dausier 等进行了绵羊体外受精试验, 并获得了原核期受精卵, 但直到 1985 年, 才获得绵羊体外受精后代^[23]。1982 年, Brackett 等获得了世界首例试管犊牛^[24]。1973 年, 猪的体外受精获得成功, 并得到卵裂胚, 1986 年获得试管仔猪^[25], 1989 年获得 IVM-IVF 仔猪^[26]。1985 年, 世界首例试管山羊在日本降生。1990 年, 钱菊汾等获得世界第二例试管山羊^[27]。同年, 段恩奎等获得山羊异体受精的成功^[28]。1992 年, 刘灵等获得首批山羊卵泡卵母细胞 IVM-IVF 试管山羊^[29]。1994 年, Coonrod 等获得美洲红羊试管后代^[30]。

在牛上, 70 年代在电镜下进行其超微结构研究, 并进行卵泡卵母细胞 IVM-IVF 的研究, 80 年代才取得了牛体外受精的重大突破。1982 年, Brackett 获得第一头试管犊牛, 随后日本、美国、英国、丹麦、新西兰、意大利的许多学者都致力于牛体外受精的研究并生产出大量的牛胚胎, 并开始向产业化方向迈进^[31]。尤其是卢克焕世界首例试管双犊的报道, 又将牛的体外受精技术推进了一大步^[32]。我国牛体外受精技术起步于 80 年代后期, 但进步却很快。1989 年以来, 旭日干^[33], 范必勤^[34], 朱裕鼎^[35], 卢克焕^[36], 秦鹏春^[37], 石德顺^[38]等相继获得了

试管犊牛,标志着我国试管牛研究已接近或达到世界先进水平。目前,一套高效的牛胚胎体外生产程序已经建立起来,并逐步的进入到生产推广的产业化阶段。

在水牛上,与黄牛体外受精相比,水牛体外受精技术发展相对缓慢,所生产的胚胎数量也较少。1991年, Madan 等获得了世界第一头水牛体外受精犊牛,取名“Pratham”^[39]。我国在水牛体外胚胎移植研究是上世纪90年代才开始。1993年,广西农业大学繁殖研究室的蒋和生博士进行水牛卵母细胞体外受精,获得了我国首例“试管水牛”^[40]。此后该项研究日趋完善,从卵母细胞的采集、体外培养、精子体外获能、卵母细胞体外受精、受精卵的体外培养、胚胎冷冻、胚胎移植等方面取得了突破性进展^[41-52]。中国农科院广西水牛研究所在2001-2004年共生产试管水牛24头,全部成活,是目前世界最大的全体外化试管水牛群^[53]。然而体外受精技术在水牛上的利用效率仍然不是很高^[54]。水牛体外受精还处在实验室阶段,尚未达到应用于生产的水平,整体效率还有待提高和完善。

第三节 哺乳动物早期胚胎体外培养的

生物学原理与研究进展

由于体外培养早期胚胎存在“发育阻断”(block of development)问题,近年来,人们着重把精力放在克服“发育阻断”方法的研究上。根据胚胎在体内存在的微环境,在克服早期胚胎体外发育阻断,提高胚胎质量和发育率上,主要从两方面进行探索:(1)改良培养液的成分;(2)利用各种辅助细胞建立联合培养系统。其目的是为了最大限度地满足胚胎在不同细胞期对物质的全面需求,尽可能使体外环境与体内环境相吻合,为早期胚胎营造一种理想生存环境。

3.1 早期胚胎代谢特点及营养需求

哺乳动物胚胎在从合子发育到囊胚的过程中,由于参与物质代谢的酶的活性不同,所以在不同发育阶段,利用外源性营养物质的代谢途径及能力也不同,因此对能量、蛋白质和其他物质所需要的量和种类都有所不同。而在胚胎体外培养研究过程中,往往用一种培养液连续培养早期胚胎使其发育到晚期,这很容易造成物质供应的失衡和胚胎在发育过程中自身代谢产物的增加和一些毒性物质的积累,这些产物在不同程度上都对胚胎发育不利,故了解胚胎的营养需求非常重要。

3.1.1 葡萄糖

Brinster (1965) 发现, 葡萄糖对随机交配的Swiss小鼠 2-细胞胚有轻微毒害作用, Schini发现培养液中的葡萄糖和磷酸盐引起仓鼠 2-细胞阻断^[55], 葡萄糖对牛^[56]、猪^[57]、绵羊^[58]、小鼠^[59]早期胚胎发育也有抑制作用。在有乳酸盐、丙酮酸盐和牛血清白蛋白(BSA)的TCM-199中培养牛受精卵时, 在受精后 96 h再给培养液中加入葡萄糖, 发育到桑椹胚和囊胚的比率显著高于在受精后 8 h和 48 h加入葡萄糖, 说明葡萄糖对牛早期胚胎体外发育有阻断作用。研究表明, 牛早期胚胎在 2-细胞期就能代谢葡萄糖, 但在 8-16-细胞期和扩张囊胚期葡萄糖代谢呈现大幅度增加^[56]。培养液中添加谷氨酰胺能提高仓鼠^[35]、小鼠^[39]和猪^[57]胚胎突破体外发育阻断的能力。牛早期胚胎对谷氨酰胺的代谢比桑椹胚及囊胚高, 证明谷氨酰胺可能是牛早期胚胎的主要能量来源^[56]。

通过对附植前胚胎葡萄糖代谢的研究可以发现早期胚胎对葡萄糖代谢活动较低的原因。对猪、绵羊、牛和人胚胎代谢研究的结果表明, 葡萄糖代谢首次显著增加发生在胚胎基因组活化的时期, 只有胚胎基因组活化后才能合成启动胚胎葡萄糖代谢的一种或多种关键酶, 特别是胞内磷酸果糖激酶(PFK)的水平与葡萄糖利用有关。小鼠早期胚胎 8-细胞以前磷酸果糖激酶含量的缺乏抑制了葡萄糖的利用, 阻止胚胎进一步发育。小鼠、猪、绵羊、牛和人胚胎中, 从 2-细胞开始到囊胚, 葡萄糖代谢活力呈逐渐增加趋势, 其中牛从 2-细胞到扩张囊胚, 葡萄糖代谢增加30倍。但这种增加趋势并不是呈直线性的, 而是呈胚胎基因组活化后的阶梯状增加。同时发现小鼠胚胎在有葡萄糖的培养液中培养时, 糖原含量显著高于体内发育的胚胎, 因为早期胚胎已具有葡萄糖的易化转运系统, 可将葡萄糖运到胚胎细胞体内, 但早期胚胎缺乏葡萄糖分解酶系, 因此进入早期胚胎的葡萄糖被转化为糖原储存^[58], 糖原的异常积累能够导致早期胚胎的发育阻断; 葡萄糖本身还能增强糖原合成酶-3的活性, 这是一种调节糖原合成的因子, 一旦该酶活性增强, 也可引起胚胎发育受阻, 早期胚胎虽不以葡萄糖为能量底物, 但葡萄糖或其通过磷酸戊糖途径代谢的残基参与一些物质如三酰甘油酯、磷脂、核酸、NADPH等的生物合成^[59]。自然情况下葡萄糖也存在于动物输卵管和子宫液中(牛为 5-10 mmol/L, 兔及绵羊为 1.5 mmol/L, 小鼠为 5.2 mmol/L), 所以体外培养液中低剂量的葡萄糖添加是必要的。半乳糖或 5.0 mmol的葡萄糖对胚胎的发育有损伤作用, 0.25 mmol的果糖不仅具有与 0.5 mmol葡萄糖对胚胎植入和胎儿存活有促进作用, 而且还显示出能增加囊胚中的细胞数量^[60], 所以在体外培养胚胎时, 应根据各种动物胚胎发育的不同阶段的代谢特点, 合理增加葡萄糖, 在早期用其他营养物质(如谷氨酰胺)作为能量物质, 然后在适当的时期加入适量葡萄糖以供后期胚胎发育利用。

3.1.2 氨基酸

许多动物从卵母细胞到囊胚都能吸收氨基酸,因此体外培养液中加入氨基酸有利于克服胚胎的发育阻滞,促进胚胎的早期发育,增强其植入后的发育能力。Spindle 等证实氨基酸能增强小鼠囊胚的孵化率^[61],必需氨基酸、非必需氨基酸和谷氨酰胺通过氧化能量物质对囊胚腔的形成,滋养层细胞数量的增加及孵化率有促进作用^[62-64],由此可以看出培养系统中的氨基酸是影响胚胎孵化率的重要因素,现已证实,输卵管液和子宫液内含有大量的游离氨基酸^[65-67],氨基酸是早期胚胎细胞功能的重要调节者,通过调节胚胎能量产生方式来促进培养过程中胚胎的发育^[68, 69]。

测定小鼠卵母细胞、8-细胞及囊胚的 17 种内源性氨基酸含量表明,大部分氨基酸从 8-细胞到囊胚都增加 2-3 倍,牛磺酸、甘氨酸、丙氨酸、谷氨酸和天冬氨酸一直处于高水平,在胚胎发育的各阶段,各种氨基酸在总氨基酸中所占比例不同^[68]。附植前小鼠胚胎对外源性氨基酸的吸收量在 8-细胞起之后显著增加,囊胚阶段的转运速度最大,这就为囊胚孵化、生长和附植及滋养外胚层组织和内细胞团发育成不同类型的细胞作好了准备^[69]。

研究表明 Eagle 氏非必需氨基酸和必需氨基酸在胚胎不同发育阶段的作用不同。胚胎致密化之前,必需氨基酸没有作用,但对后期囊胚的发育有促进作用,主要表现在增加内细胞团分裂率和植入后胎儿的发育能力。非必需氨基酸和谷氨酰胺对致密化后期胚胎的发育也有利,能促进胚胎向囊胚的发育和胚泡的形成,并增加滋养层细胞数量和囊胚的孵化能力^[68, 69]。

非必需氨基酸和谷氨酰胺对胚胎的保护和促进作用表现在:能调节胚胎的能量代谢;调节渗透压,保持细胞内生理稳定;非必需氨基酸和谷氨酰胺在致密化前期胚胎发育的作用有协同性。单独使用谷氨酰胺不能促进牛胚胎向 8-16-细胞转化,非必需氨基酸与谷氨酰胺不配合也会降低其效能。针对以上特点,在胚胎培养的前 48 h (小鼠) 或 72 h (牛) 给培养液中加入非必需氨基酸和谷氨酰胺,然后再加入全部 20 种氨基酸,不仅能提高胚胎稳定发育的效率,而且胚胎发育的质量也高^[58]。

3.1.3 蛋白质

一般认为胚胎发育阻断和胚胎基因组转录都与胚胎内蛋白质合成缺失有关。所以培养液中蛋白质含量不足或过量都对早期胚胎的发育有一定影响。

目前,用于胚胎培养液中的蛋白有牛血清白蛋白(BSA)、牛血清(CS),一般认为 CS 优于 BSA,因为血清组成复杂,包括生长因子、激素、维生素、矿物质、细胞因子以及一些还未被确定的物质。血清在保持细胞的存活、促进生长、维持细胞 pH 及渗透压的稳定、增加细胞弹性及膜的完整性方面都发挥着重要作用

用。研究发现不同来源的血清对胚胎的质量有很大影响。对大鼠、小鼠及兔胚胎的测量表明,从1-细胞到桑椹胚,某些品种甚至到早期囊胚蛋白质含量不发生变化或很少变化,只有在囊胚阶段才有所增加。由此提示在早期卵裂阶段培养胚胎时可不用血清,而在稍晚培养液中应加入10%-20%(v/v)的牛血清或人血清^[70]。

3.1.4 乳酸盐和丙酮酸盐

在小鼠和家兔的实验表明,早期胚胎只能利用丙酮酸钠和乳酸钠而不能利用葡萄糖,说明乳酸盐和丙酮酸盐作为早期胚胎营养物质对早期胚胎卵裂有作用,但它们所起的作用因动物胚胎种类不同而异。Dams认为乳酸盐和丙酮酸盐对猪胚胎体外发育有抑制作用,当时用的培养液mKRB中含25mM乳酸钠,0.25mM丙酮酸钠,5.56mM葡萄糖培养猪1-2-细胞胚胎发育未超过8-细胞期(10个胚胎),改为培养猪4-细胞期胚胎,结果有11%-13%发育到囊胚,而未加乳酸盐和丙酮酸盐的却有42%-46%发育到囊胚^[78]。但后来报道,Nie-rnann等和王俊勋等的实验却发现添加这两种物质更有利于猪胚胎的发育并无明显的抑制作用^[74]。值得注意的是,有人发现加丙酮酸盐不加乳酸盐时,胚胎发育未受抑制,两者同时添加时胚胎发育明显受到抑制^[71]。体外培养牛1-细胞胚胎时,在含BSA的TCM-199中加入乳酸盐和丙酮酸盐时,显著提高发育到桑椹胚和囊胚的比率。丙酮酸盐为小鼠、牛、绵羊胚胎从1-细胞发育到桑椹胚和囊胚所需营养物质,但丙酮酸盐抑制仓鼠1-2-细胞胚胎发育。乳酸盐和丙酮酸盐的比例,亦影响早期胚胎发育的效果,而且用不同的培养液培养早期胚胎二者的比例亦有不同。Walker等用SOF培养绵羊1-细胞胚胎时,以0.33mM丙酮酸盐为标准与0.33mM乳酸盐组合,当乳酸盐浓度为3.3mM时发育到囊胚和孵化囊胚的比率显著高于其它浓度,在牛上也得到相似的结果^[72]。

3.1.5 维生素

维生素不影响胚胎形态,但显著促进细胞对葡萄糖的摄取和乳糖合成^[73]。而且还证实,维生素作为碳水化合物和氨基酸代谢过程中不可缺少的成分,能改善涉及能量代谢的酶的活性。在绵羊和鼠胚实验上发现,维生素增加了绵羊胚胎对葡萄糖的利用率,促进了鼠胚的孵化^[73]。

3.1.6 其他营养物质

业已证明,肌醇为小鼠和兔胚发育所必需,亦促进仓鼠囊胚孵化。肌醇是合成磷酸肌醇和其他磷酸肌醇的前体物质,在培养液中加入肌醇可能会提高哺乳动物的体外囊胚发育率^[74]。

实验发现,在用BSA的TCM-199培养牛1-细胞胚时,加入胰岛素、转铁蛋白和亚硒酸钠,囊胚发育比率显著高于对照组。胰岛素能促进细胞DNA、RNA、

蛋白质和脂类合成,调节质膜、酶和细胞核的功能。转铁蛋白有益于铁的转运而与细胞结合,减轻早期胚胎代谢产生的毒性金属离子的积累。亚硒酸钠阻止游离氧对早期胚胎细胞的毒害^[74]。

二巯基乙醇作为还原剂,起到抗氧化作用而解除氧化物对胚胎的毒害作用。超氧歧化酶(SOD)和过氧化氢酶是氧自由基的清除酶,对胚胎代谢产生的氧气的有毒代谢物,如超氧根离子(O⁻)、过氧化氢(HO)和氢氧根离子(OH⁻)可以进行有效的清除,减少异常卵裂发生率。乙二胺四乙酸(EDTA)作为一种螯合剂,也可以减少氧自由基的产生,消除重金属离子的毒副作用,对细胞起到很好的保护^[74]。

3.2 早期胚胎基因组的激活与启动

哺乳动物的早期胚胎发育是由卵母细胞成熟过程中所积累的蛋白质和mRNA驱动的,早期卵裂时期的转录导致蛋白质合成在质和量上的变化,从而产生控制转录的母本/胚胎转换(maternal-embryonic transition,MET)。由母型调控转入胚胎型主动调控需要胚胎基因的启动,使遗传信息翻译成蛋白质,参与胚胎的各项功能活动^[75]。

早期胚胎的胚胎型基因组启动时间因动物不同而异,在牛早期胚胎的胚胎基因组的转录活性发生在8-细胞期以后,小鼠始于2-细胞期^[76, 77]。对于牛的早期胚胎来说,胚胎型基因组启动之前,添加抑制剂抑制基因转录活动,不影响合子的卵裂,但却能阻滞8-细胞期卵裂,这充分说明,牛早期胚胎在8-细胞之前的蛋白质合成,是依赖于母型转录活动完成,而8-细胞以后则需要胚胎型的调控转录。此外,在研究胚胎早期卵裂阶段RNA变化时人们发现,在胚胎发育过程中胚胎的RNA总量不但没有减少,而且还不断增加,到囊胚期RNA增加更加明显,这主要是胚胎基因组激活和转录的结果^[77]。

3.3 早期胚胎发育阻滞

3.3.1 引发早期胚胎体外发育阻滞的因素

3.3.1.1 氧自由基的伤害

在研究早期胚胎发育的过程中发现,遭受氧自由基的伤害可能是引起小鼠2-细胞发育阻滞的原因之一。低氧分压环境似乎更有利于早期胚胎的发育。而超氧化物歧化酶(SOD)催化超氧离子歧化成H₂O₂,对保护胚胎免受氧自由基伤害起到重要作用。添加SOD有助于克服2-细胞发育阻滞。在经电子自旋共振处理的兔输卵管内,已检出SOD活性。蛋白质上的巯基是氧化作用最薄弱的对象之一。硫氧还原蛋白作为二硫化物还原酶被证明在提高早期胚胎体外发育能力上极为

有效,但也有人认为它对突破阻滞没有帮助。另外,半胱氨酸、抗坏血酸、脱铁蛋白、转铁蛋白和乙二胺四乙酸(EDTA)也有助于克服氧自由基的伤害。而且,加入转铁蛋白后,通常能使小鼠 2-细胞发育阻滞的胚胎发育至囊胚,其发育速度和达到囊胚的比例均接近于体内发育的程度。有关早期胚胎防御氧自由基伤害的具体机制目前还有争议,但被普遍接受的是氧自由基伤害对早期胚胎体外发育阻滞的影响不可忽视。从蛋白质巯基的抗氧化力到超氧化物歧化能力等不同层次的研究都表明,早期胚胎对氧自由基伤害极其敏感,也许是因为该时期的胚胎尚不具备较成熟的抗氧化能力,需要补充某些外源酶(可能来自输卵管液),而体外培养的早期胚胎可能因丧失这一外源酶而不能免于氧自由基的毒害^[78]。

3.3.1.2 培养液成分的平衡

目前广泛使用的培养液有BMOC-2, M16, M1, M2, BWB和TCM-199等。但在这些培养液中多数品系的小鼠早期胚胎都不能避免发生2-细胞阻滞。此后为克服阻滞而专门设计了各种改良液。CZB在BMOC-2的基础上增加了EDTA,以谷氨酰胺代替葡萄糖,以及提高乳酸和丙酮酸的浓度比。近几年又有新的培养液出现,如MTF(Mouse tubal fluid),它是把M1中的葡萄糖、丙酮酸和乳酸调节到与输卵管内一致的浓度。在这些培养液中 2-细胞阻滞得到了不同程度的克服。显然培养液组分及某些养分间的平衡关系对早期胚胎体外发育的影响很大^[79]。

乳酸和丙酮酸是较早受到关注的一对培养液组分。在糖酵解和三羧酸循环途径中只有包括丙酮酸和乳酸在内的 4 种成分和支持小鼠胚胎从 2-细胞到 8-细胞的发育所必需的。丙酮酸作为体外培养液中的重要组分支持所有种类的胚胎着床前发育^[79]。丙酮酸/乳酸的比值与 2-细胞胚胎的发育状况有关,比值在120左右有利于阻滞型胚胎的正常发育^[80]。

对仓鼠的研究发现,培养液中的葡萄糖和无机磷酸盐协同作用引起 2-细胞阻滞,二者缺一便无抑制作用^[81]。CZB 培养液以 1 mmol/L 谷氨酰胺代替葡萄糖,使多种阻滞品系的小鼠胚胎能够发育到囊胚。在含磷酸盐的溶液里发生阻滞的小鼠品系AKR/N,在不含磷酸盐的溶液里却几乎不发生阻滞^[82]。葡萄糖可能抑制了某些重要的代谢途径^[80]。而磷酸盐的抑制效应似乎是通过葡萄糖产生的,因为一旦去除葡萄糖,磷酸盐就无抑制力。哺乳动物着床前胚胎的中间代谢与体细胞显著不同。尽管同样以线粒体氧化代谢为主要途径,但体外培养的早期胚胎在12-细胞期间不能利用葡萄糖,需直接补充丙酮酸。对葡萄糖的转运和利用一直要到 8-细胞期才开始。在含葡萄糖/磷酸盐的体系内,可能因葡萄糖的存在和磷酸盐激活作用而增进的糖酵解抑制了线粒体氧化代谢,能量的匮乏最终导致发育阻滞^[81]。

NaCl、谷氨酰胺和葡萄糖对胚胎的影响也具有协同性。在不含谷氨酰胺的培养体系内,提高NaCl浓度可引起阻滞,加入谷氨酰胺则能消除这种阻滞。因而认为,谷氨酰胺的保护作用可能是充当有机渗透剂^[83]。但也有人认为,谷氨酰胺是作为被优先利用的能源底物而起作用^[81]。通过降低培养体系中的NaCl浓度可以同时减轻葡萄糖对培养胚胎的抑制。

体内环境和体外环境的一个重要差别在于,前者提供了适合胚胎发育的平衡体系。不同养分之间应有的平衡关系一旦被打破,阻滞就不可避免。早期胚胎的代谢机制有着不同于体细胞的特殊性,对培养体系的要求也有别于一般培养细胞。

3.3.1.3 外源信号的作用

研究发现,小鼠 1-细胞胚胎在与牛输卵管上皮细胞或个别细胞株,如牛肾细胞(MDBK)等共培养能获得较高的囊胚发育率,甚至腹腔巨嗜细胞也被用来改善小鼠早期胚胎的体外发育,且效果也非常明显^[78]。

着床前胚胎的正常发育对外源信号刺激可能有一定的依赖性,体外培养的胚胎发育也许是由于未能获得足够的推动细胞周期的信号而停滞。可以料想,共培养的外源细胞可以通过为其提供某种信号而推动发育进程。Chatot研究发现,与兔输卵管上皮细(ROEC)共培养能克服昆明小鼠早期胚胎的体外发育阻滞,用抗血清去除ROEC条件培养液中的分泌蛋白,阻滞现象便又发生。可见,是ROEC分泌的因子起到了解除阻滞的作用。某些细胞株以及巨嗜细胞等对早期胚胎体外发育的支持是否也是通过同样的因子实现,这些都还有待于进一步研究证明^[78]。

3.3.2 早期胚胎发育阻滞的突破

哺乳动物早期胚胎在体外培养过程中,胚胎的物质代谢、培养液 pH 值、离子浓度和营养组分等多种因素均可影响其正常发育,导致发育阻滞。因此,通过调整培养基组分或者添加某些特殊物质可以帮助早期胚胎突破发育阻滞期。

Chatot 等在小鼠早期胚胎发育阻滞的研究中发现,在小鼠早期胚胎培养液中加入葡萄糖会抑制其发育,而培养液中以谷氨酰胺取代葡萄糖可以使小鼠胚胎突破 2-细胞阻滞^[84]。Larson 等在牛早期胚胎培养液中研究中发现,添加纤维连接蛋白和 TGF- β 等生长因子能够促进牛早期胚胎突破 8-细胞阻滞;牛早期胚胎与输卵管上皮细胞共培养,可克服 8-16-细胞阻滞^[85]。王海滨等在早期胚胎培养液中除去葡萄糖和磷酸盐,添加果糖、牛磺酸、EDTA、谷氨酰胺和氨基酸,结果改善后的培养液可以使小鼠早期胚胎突破 2-细胞阻滞发育到囊胚,囊胚发育率高达 85%^[86]。

3.3.3 影响胚胎体外培养体系的关键因素

体外受精、体外培养的早期胚胎只有发育到桑椹胚或囊胚后才有希望移植后获得较高的妊娠率,多少年来世界上科技人员对体外生产胚胎进行了艰苦卓越的研究,许多哺乳动物卵母细胞体外成熟、体外受精和体外培养都获得了成功,而且很多试管动物诞生,但是直到今日,利用卵母细胞体外生产胚胎的培养条件仍旧缺乏系统而一致的理论依据,也几乎不存在系统而程序化的培养方案,因此,体外生产胚胎仍然处于探索阶段,只有在试验研究中不断改善培养条件才能在提高胚胎发育率的经验积累中建立和完善胚胎体外培养体系。

目前体外早期胚胎体外培养体系基本上可分为两类,一类是合成培养液胚胎体外培养体系,一类是体细胞及体内大分子物质与胚胎共培养体系。

合成培养液胚胎体外培养体系,是模拟胚胎发育的体内环境,通过人工合成成分确定的早期胚胎培养液,如 TCM-199, CRLaa 或 SOF 液等,后两者以 TCM-199 为基础添加 BSA、维生素、氨基酸和抗氧化剂等物质形成新的胚胎培养体系。合成培养液胚胎体外培养体系成分明确,有助于了解早期胚胎发育过程中每一种物质对胚胎的作用效果,因而主要应用于早期胚胎发育机制研究^[87]。

体细胞及体内大分子物质与胚胎共培养体系,主要利用生殖道上皮脱落物、卵丘颗粒细胞和血清等与早期胚胎共同培养,以最接近体内环境的培养体系促进胚胎发育,提高胚胎发育率。共培养的作用机理在于可能的作用机制有如下 3 种:第一,共培养细胞可分泌一些对早期胚胎有利的物质,目前研究得最多的是生长因子和糖蛋白。生长因子对胚胎发育的促进作用已有报道。转化生长因子(TGF- α 和 TGF- β)和表皮生长因子(EGF)能显著提高牛早期胚胎发育到囊胚的比率^[87],EGF 还能促进小鼠囊胚滋养层的蛋白合成^[88],胰岛素和类胰岛素生长因子(IGF-I)能提高胚胎致密化和囊胚形成比例,促进蛋白质合成^[89]。IGF-II 是小鼠胚胎正常发育所必需的^[90]。Larson 等在简单培养基中添加 TGF- β 和牛成纤维细胞生长因子(bFGF),能使 39%的牛早期胚胎通过 8-细胞阻断,而对照组胚胎无一例通过阻断^[91];第二,共培养体系可以代谢降解胚胎发育过程中产生的有毒物质,如胺、次黄嘌呤和氧自由基等。Joo 等将小鼠体内 1-细胞胚胎与人输卵管细胞共培养发现,与对照组相比共培养组的氧自由基浓度明显降低^[92],说明共培养细胞可以消除氧自由基对胚胎的不利作用。胺和次黄嘌呤也是胚胎发育过程中产生的物质,共培养细胞可能通过降解培养液中的胺和次黄嘌呤,削弱二者对胚胎的不利影响^[93];第三,共培养细胞可能通过胚胎与细胞接触促进胚胎发育。Joo 等将小鼠的体内 1-细胞胚胎与人输卵管上皮细胞共培养,在胚胎与细胞之间放一插入物,使胚胎与细胞不接触,发现无一例胚胎发育到囊胚,而共培养中有 45%的胚胎发育到囊胚^[93]。这说明在胚胎与体细胞不接触的共培养体系体细

胞对胚胎的有利作用消失,但目前有关体细胞条件化培养基的研究证明,体细胞与胚胎不接触也能促进胚胎发育。Rehman 等用大鼠肝细胞(BRLC)条件化培养基培养牛IVM-IVF胚胎,发现胚胎在条件化48h的培养基中发育到囊胚的比例为56.3%,共培养中囊胚的比例为59.6%,对照组中囊胚的比例为27.8%^[94]。说明条件化培养基支持牛早期胚胎发育,效果与共培养相差不明显。Benjamin等利用血清添加的培养液(TCM-199+血清)与早期胚胎共培养,囊胚发育率达40%^[95];Eyestone等用输卵管单层上皮与牛早期胚胎共培养,桑-囊胚发育率为43%^[96]。

大量的研究报道证明上述体细胞和血清与胚胎共培养可以有效促进早期胚胎体外发育,但Van Inzen认为,除了上述体细胞与胚胎共培养效果良好外,其他体细胞类型(皮肤、睾丸、肝)的条件液也能维持牛胚胎体外发育^[97]。

早期胚胎培养体系虽然尽可能地模拟体内环境,但远远达不到体内发育的条件。胚胎在雌性动物输卵管发育时处于微量的液体环境中,胚胎自身分泌的活性因子能够参与胚胎发育的基因组激活和后期发育,但是,在体外培养时,胚胎处于相对过多的胚胎培养液中,自身分泌的活性物质和信号物质被稀释,失去其生物功能,因而在体外培养中研究人员应用不超过50 μ L的微滴进行早期胚胎培养,以减轻液体环境对胚胎活性物质的稀释。Lane等研究结果表明,降低培养液体积可以提高小鼠受精卵卵裂率和囊胚率,并可以显著提高胚胎成活率^[98]。

此外,胚胎从雌性动物输卵管运行到子宫的整个发育过程中,随着胚胎发育阶段不同及所处生殖道部位不同,胚胎对营养组分和液体环境的要求也在不断变化,母体为胚胎提供的液体环境也不尽相同,母体为胚胎提供的发育环境处于一种动态变化之中,而且,胚胎在生殖道运行过程中,生殖道相关腺体分泌的因子也在对胚胎的发育进行调控。Mermillod等指出,来自牛输卵管液中的2个因子支持了牛胚胎发育,小于10 KDa的低分子量物质使胚胎达5-8-细胞;另外一种高分子量的物质则允许胚胎由8-细胞发育到囊胚^[99]。与体内环境相比,在体外培养时,培养体系是静止的、孤立的,因而具有相当的难度与不稳定性。

胚胎体外培养体系受培养液组分、pH值、培养温度和气相条件等多种因素影响,要做好早期胚胎的体外培养需要以下几个方面:

3.3.3.1 离子因素

无机盐离子是胚胎培养液的重要组成部分,直接和间接参与胚胎的代谢过程;而且无机盐可以维持培养体系的渗透压,缓冲酸碱度,对于胚胎的正常发育发挥着至关重要的作用。

早期胚胎培养液离子组分的确定是以哺乳动物妊娠早期雌性生殖道液体离

子组成为依据的, 据相关检测, 妊娠早期哺乳动物输卵管中含有高浓度的 K^+ 和 Cl^- ; Roblero 等研究表明, 早期胚胎培养液中高浓度的 K^+ 代替部分 Na^+ 有利于胚胎发育; 早期胚胎培养液中的 Na^+/K^+ 比值显著影响胚胎的体外发育, 最适宜的 Na^+/K^+ 比值为 11.4:3.2^[100, 101]。

Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 也是胚胎体外培养所必须的有效成分, Ca^{2+} 对于维持细胞膜的稳定性、通透性及细胞之间的联接发挥重要作用, 这对于桑椹胚细胞间紧密联结和囊胚的形成与扩展至关重要; Mg^{2+} 是构成酶活性中心的重要组分, 特别是糖酵解和三羧酸循环中许多酶的辅酶, 这些酶与辅酶直接关系到能量代谢能否正常进行; 研究表明, 缺乏 Ca^{2+} 会显著降低牛胚胎发育的囊胚率, 缺乏 Mg^{2+} 会制约牛早期胚胎正常发育^[100]。

Zn^{2+} 对早期牛胚胎在体外发育有显著的促进作用, Cu^{2+} 对早期牛胚胎在体外发育有强烈的抑制作用^[101]。

在早期胚胎体外培养中, 很多离子都很关键, 但是对于一个培养体系来说, 离子之间存在非常微妙的相互协同和相互拮抗作用, 所有离子之间必须充分协调才能达到良好的培养效果。

3.3.3.2 营养因素

哺乳动物卵母细胞体外受精后, 从受精卵发育到桑椹胚、囊胚, 在整个发育过程中胚胎对营养的需求会随发育阶段的不同出现差异, 而且在营养消耗的同时胚胎自身代谢产物增加, 有害物质积累, 因而深入研究体外培养的营养因素十分重要。

(1) 能量物质

用于早期胚胎体外培养的能量物质主要有葡萄糖 (G) 和丙酮酸, 葡萄糖和丙酮酸分别通过糖酵解途径和氧化磷酸化途径提供能量, 这两种物质在胚胎发育的不同阶段发挥的作用不同。

Thompson 和 Harvey 等研究表明, 通过磷酸化抑制剂抑制丙酮酸的氧化磷酸化可以严重抑制胚胎致密期之前的发育, 而不能抑制胚胎致密期之后的发育, 说明胚胎在胚胎致密期之前的发育主要通过丙酮酸的氧化磷酸化途径提供能量; 同样, 通过乙烯二胺四乙酸抑制剂抑制糖酵解可以严重抑制胚胎致密期之后的发育, 而不能抑制胚胎致密期之前的发育, 说明胚胎在致密期之后的发育主要通过葡萄糖的糖酵解途径提供能量^[102, 103]。

此外, 有关资料认为, 在致密期之前的早期胚胎不但不能利用葡萄糖, 而且在葡萄糖存在的情况下会对胚胎早期发育产生明显的抑制作用, 但是, 葡萄糖对

于胚胎发育后期（桑椹胚或囊胚）十分重要^[103]。

体外研究发现小鼠胚胎在 8-细胞期开始代谢葡萄糖，牛胚胎在 2-细胞期开始，在 8-16-细胞期葡萄糖代谢大幅度增加，在缺乏葡萄糖时，丙酮酸作为能量物质可以支持胚胎发育；但在乳酸盐存在的条件下，丙酮酸作用受到限制，另外乳酸盐和丙酮酸的比例也是影响胚胎的发育的一个重要原因^[104]。

总之，在胚胎发育的全过程中，各种能量物质存在密切的协同与拮抗作用，三者的相互协调才能保证早期胚胎的正常发育。

（2）氨基酸

氨基酸是早期胚胎培养的一种重要物质，在正常生理情况下，哺乳动物输卵管和子宫中含有 20-25 种哺乳动物所需要的必需和非必需氨基酸，这些氨基酸在胚胎生长发育过程中发挥着不可替代的重要作用^[1]。

具体来说，谷氨酰胺是胚胎代谢的主要氮源，可以促进胚胎细胞的早期分裂，增强胚胎体外发育能力^[105]；在乳酸钠存在的情况下，谷氨酰胺对于卵母细胞体外成熟和胚胎体外发育有明显的促进作用；牛磺酸除了能够促进胚胎发育外，还具有抗氧化作用和解毒作用；甘氨酸可以维持细胞内渗透压，增强胚胎对高离子浓度环境的抗逆能力^[106]。此外，许多研究表明，在早期胚胎培养液提高氨基酸的含量可以显著提高卵裂率和囊胚率。

目前，牛羊早期胚胎培养液（牛 CR1aa，羊 SOF）中谷氨酰胺的含量为 1 mM，其它必需氨基酸（EAA）和非必需氨基酸（NEAA）添加量分别为 2%（V/V）和 1%（V/V）。

（3）蛋白质

胚胎发育阻滞和胚胎基因组转录都与胚胎内蛋白质合成有关，胚胎培养液中蛋白质含量不足与过剩都会对早期胚胎发育有一定的影响，因此，蛋白质也是早期胚胎培养的一种重要物质。

用于早期胚胎培养的蛋白质来源主要有血清和牛血清白蛋白（BSA），血清中含有胚胎生长的有效促进物质，如蛋白质、氨基酸、脂肪酸、维生素、激素、螯合金属离子及各种多肽类生长因子，这些物质成分复杂，协同紧密，很难确定每种成分的具体作用方式^[79]。

另有研究认为，血清对早期胚胎发育具有双重作用，血清对于受精卵（牛受精卵 1-细胞期）的卵裂有制约作用，但对桑椹胚的发育和囊胚的形成有促进作用，因此有人认为在卵裂前期的培养液中不加血清，而在胚胎发育后期加入血清

以提高胚胎质量,至于血清对于胚胎发育前期与后期的作用机制目前尚未研究清楚^[79]。

(4) 维生素

胚胎培养液中有时会添加维生素,但维生素对胚胎发育的作用机理尚未了解。

根据各种维生素的生理功能,研究人员推测 V_E , V_C 和 V_B 对有胚胎体外培养具有促进作用。 V_E 具有抗氧化功能,可以保护细胞免受氧化损伤;在抗氧化方面 V_C 有协同作用; V_B 族是碳水化合物和氨基酸代谢的不可分割的部分,可能在培养发育中起重要作用,但是目前对其作用机制尚不清楚^[1]。

3.3.3.3 调控因素

(1) 生长因子

生长因子作为细胞功能调节的信号传导物质对于胚胎早期发育的调控作用相当重要,生长因子虽然微量,但是活性很强,它的表达可以促进或抑制胚胎的生长和发育。

参与胚胎发育调控的生长因子主要有表皮生长因子 (FGF)、胰岛素样生长因子 (IGF-1 和 IGF-2)、血小板生长因子 (PDGF)、转化生长因子 (TGF- β) 和激活素 A (activin A) 等,这些生长因子来自母体生殖道的旁分泌或者胚胎本身的自分泌,均对胚胎的发育产生重大影响;同时在胚胎细胞信号传导的研究中,研究人员在胚胎发育的不同阶段发现了多种生长因子受体^[107-109],这说明不同发育时期的胚胎对不同生长因子的需求量不同,如小鼠胚胎从 2-细胞开始表达转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), 8-细胞开始表达表皮生长因子 (EGF), 桑椹胚和囊胚期表达血小板生长因子 A 链 (PDGF-A Chain) 以及转化生长因子 α (TGF- α), 对此,在早期胚胎培养液中添加这些生长因子时,要注意胚胎不同发育阶段选择不同的生长因子,这样才能促进胚胎的正常发育^[108]。

但是,生长因子的信号传导机理、作用途径和作用方式,以及生长因子之间的协同作用还有待于更为深入的研究。

(2) 激素

在早期胚胎体外培养中应用激素的研究较少,Iwata 为了改善早期胚胎体外培养条件,研究了生长激素 (growth hormone, GH) 在胎牛血清 (fetal calf serum, FCS) 和牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 协同下对牛早期胚胎不同发育阶段的作用效果^[110]。

研究表明,在牛卵母细胞体外受精后 18-48 h (1-8 细胞期胚胎)的胚胎培养液中,不管是否有 FCS 或 BSA 存在,添加生长激素 (GH) 对于胚胎发育没有任何影响;体外受精后 48-120 h (5-细胞-桑椹胚胚胎),在 BSA 存在的情况下,添加生长激素 (GH) 能增加囊胚中细胞数量,而 FCS 单独存在时添加 GH 没有此协同效果;体外受精后 120-192 h (桑椹胚-囊胚),在 FCS 存在的情况下,添加生长激素 (GH) 能提高囊胚率,增加囊胚内细胞的数量^[110]。

3.3.3.4 环境因素

(1) 缓冲体系

稳定的缓冲体系对于胚胎早期培养至关重要, pH 值不稳定会直接影响胚胎细胞质中活性物质的活性,阻止基因转录和翻译的正常进行,导致细胞膜上的离子通道失调、膜电压紊乱,从而也影响到 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Na^+ 等离子泵的正常生理功能^[111]。

大多数胚胎培养液所用的缓冲体系是 $NaHCO_3/CO_2$ 体系,缓冲 pH 值为 7.2-7.4。应用 $NaHCO_3/CO_2$ 缓冲体系时,培养箱内 CO_2 必须维持 5% 的气相浓度,以维持培养液中 $NaHCO_3/CO_2$ 稳定比例。 $NaHCO_3/CO_2$ 缓冲体系是哺乳动物细胞周围体液的生理缓冲体系,也是胚胎体外培养最常用的一种缓冲体系,但在体外培养时,如果培养液在空气中放置太久,由于 CO_2 的挥发引起培养液 pH 值升高,这样会导致胚胎损伤甚至死亡^[1]。

针对 $NaHCO_3/CO_2$ 缓冲体系在空气中易于挥发的特性,可以考虑体外操作时应用稳定的磷酸盐缓冲体系或 HEPES 缓冲体系,胚胎培养时在 CO_2 培养箱应用 $NaHCO_3/CO_2$ 缓冲体系,这样既避免了体外操作中由于 pH 值变化引起胚胎的损伤,也为胚胎体外培养提供了最接近体内的环境条件^[79]。

(2) 气相体系

在胚胎的早期培养中, CO_2 、 N_2 和 O_2 是与胚胎密切相关的三种气体,目前常用的胚胎体外培养气相体系主要有两种:一种是 5% 的 CO_2 , 95% 的空气,饱和湿度, $38.5^\circ C$ - $39^\circ C$ 微滴法培养;一种是 5% 的 CO_2 , 5% 的 O_2 , 90% 的 N_2 , 饱和湿度, $38.5^\circ C$ - $39^\circ C$ 微滴法培养^[1]。

比较两种气相体系,许多研究人员认为第二种 5% 的 O_2 浓度与哺乳动物雌性生殖道中氧气浓度相一致,远比空气中的 20% 的 O_2 浓度更利于胚胎发育^[100]。降低氧气浓度有益于减少过氧自由基的形成,从而减轻了高氧对胚胎的毒害作用。但也有相反的报道, Fukui 在 5% 和 20% 的氧浓度环境中培养牛早期胚胎,结果无显著差异^[113]。

尽管高浓度氧对胚胎发育有一定的影响,但目前许多实验室认为 CO_2 培养箱简单便捷,一直应用“空气+5% CO_2 ”气相体系。

(3) 抗氧化体系

在胚胎体外培养体系中容易产生一些氧的毒性代谢物,如超氧阴离子(O_2^-)、羧基自由基(HO^\cdot)、过氧化氢(H_2O_2)等,这些氧代谢物能引起膜脂的组成改变,诱导膜的不稳定性,导致异常卵裂^[79]。

葡萄糖、次黄嘌呤和氧均能增加细胞中氧基的含量从而抑制胚胎的发育,而谷氨酰胺(glutamine, Gln),还原型谷胱甘肽(glutathion, GSH),17- β -二巯基乙醇(17- β -ME)和其它抗氧化剂则通过抗氧化作用保护脂质膜免遭氧化^[114]。

此外,半胱氨酸、 V_C , V_E 和次牛磺酸都有直接或间接消除氧自由基的功能, Dematos 报道添加半胱氨酸能够促进卵母细胞胞质内谷胱甘肽的合成,从而有利于胚胎的发育^[115]。

(4) 温度体系

在早期胚胎的体外培养过程中,温度对胚胎也有很大的影响,牛羊等动物胚胎培养以 38.5°C 为宜。温度过高,胚胎发育会受到热应激影响,发育能力下降;温度过低会发生冷休克。Azambuja 将卵母细胞置于不同温度培养,发现温度偏高或偏低都不利于胚胎的发育^[116, 117]。

第四节 哺乳动物胚胎的质量评价

胚胎品质是用来评价胚胎生存能力的,它关系着胚胎发育的命运,而这种生存能力的判定是多层次的,就目前的研究来看,主要是通过胚胎形态、胚胎细胞数、冷冻保存后的发育能力、胚胎代谢活性、染色体异常与否等方面来判定胚胎是否具有继续发育的潜力。这种发育潜力直接关系着胚胎的着床及能否形成正常个体。因此,在IVF技术中对于胚胎的质量进行准确评价以选择优良胚胎是保证胚胎移植效率的重要前提。

尽管IVF技术在不断进步,胚胎在体外的发育仍不能达到最佳状态,而且大部分对培养系统的改进也仅限于根据经验进行调整,对体外培养胚胎的鉴定一般也只是通过囊胚的发育率及移植受孕率来进行评价。而从不同的侧面对胚胎在着床前进行分析评价,即可在形态学、遗传学、生物化学等方面对胚胎发育进行深

入了解,也可改进培养条件,从而达到提高体外受精胚胎发育能力的目的。

目前进行胚胎品质评价主要以形态学观察为主,即使用光学显微镜对胚胎的外形、致密度、颜色、细胞数等特征进行评价,而使用电子显微镜则主要着眼于胚胎细胞的超微结构的变化及特征。对哺乳动物胚胎进行形态学评价也只限于发育的特殊时期,即着床前的胚胎,就目前研究来看,一般认为各类哺乳动物体外培养胚胎的发育都比体内胚胎延迟,囊胚期的细胞数目也少,退化细胞则相对多一些,细胞内部结构也存在差异^[118]。另外,牛胚胎的移植受胎率只有60%左右,其中部分胚胎在怀孕的前3周流产。造成这种结果的一个很重要的原因是着床前的胚胎出现染色体异常。有关的研究表明,体内胚胎和体外胚胎都会发生染色体异常^[119-121],从而失去继续发育的能力。因此对胚胎进行细胞遗传学评价也是相当重要的。

胚胎冷冻保存后的发育能力也是胚胎质量评定的方面之一,由于长期以来人们把重点放在了冷冻方法的改进上,致使有关不同培养条件影响胚胎抗冻性的研究开展得不多。1993年,MeGowan等报道用S0F培养得到的牛IVF胚,其抗冻能力明显不及用TCM-199培养的胚胎^[122]。H. R. Tervit在绵羊上也得到了相同的结论^[123]。1995年,Kei Imai的研究表明,经CR1培养的牛IVF胚胎,冷冻解冻后的存活率也低于TCM-199^[124]。由此看来,在牛IVF卵体外发育培养过程中,采用不同的培养系统不但影响胚胎发育率,同时也可能影响到胚胎的抗冻能力。

对胚胎蛋白质组分的分析近年来也被用于胚胎质量的评定指标之一。特别是十二烷基硫酸钠一聚丙烯酰胺凝胶(sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide electrophoresis, SDS-PAGE),简称SDS电泳。近年来被广泛应用于有关胚胎学的研究中,刘林等在使用SDS-PAGE比较孤雌激活的卵母细胞与同期受精卵的不同,与同期受精卵相比则明显地缺乏分子量约为46 KD的蛋白,而分子量为69 KD的蛋白合成也不如在受精卵中那样旺盛;孤雌激活的卵母细胞蛋白质变化也不同于受精卵^[125]。Khatir等对肉牛和奶牛胚胎进行蛋白质图谱比较时在二者之间没有发现差异^[126]。Chung等在研究中利用SDS-PAGE研究了人羊水对小鼠胚胎发育的影响,结果发现孕中期的人羊水对小鼠的体外培养有促进作用,与添加孕后期人羊水组的胚胎相比,胚胎在大于110 KD和小于30 KD的蛋白的表达量上要大,可能是羊水中有利于胚胎发育的因子,而胚胎表达差异的蛋白也有可能是对胚胎发育至关重要的因子^[127]。另外Williams等对绵羊第15天的滋养外胚层的热休克蛋白做了研究,得到了令人满意的结果^[128]; Cecconi等对人胚胎的体外培养的研究中发现,经SDS-PAGE分离后如果培养液中有31 KD蛋白的蛋白条带,则对胚胎的后期发育不利^[129]。

第五节 小结与展望

但到目前为止,人们对哺乳动物早期胚胎发育机理的认识还不十分清楚,因而目前的体外受精技术及相关培养体系尚不完善,在体外培养中使用的试剂组分及操作方式不可避免地影响着胚胎发育中基因的表达方式,从而大大降低了体外受精胚的质量,很大程度上影响了体外生产胚胎的研究进程,因此,全面系统地研究哺乳动物早期胚胎发育机理,阐明影响胚胎发育过程的主要因素,是改进现有体外培养体系、不断提高体外受精胚胎质量的基础。

第二章

不同培养系统及培养液成分对水牛体外受精 早期胚胎体外发育的影响 (试验部分)

第二章 不同培养系统及培养液成分对水牛体外受精 早期胚胎发育的影响

第一节 前言

早期胚胎的体外培养是哺乳动物胚胎工程的重要环节,无论是体外受精、孤雌激活还是核移植,所得到的胚胎都要经过体外培养;大量的研究表明,早期胚胎的体外培养不仅影响胚胎的质量、胚胎体外发育潜力,而且影响移植后胚胎在体内的早期发育状况,因此,哺乳动物早期胚胎的体外培养是关系到胚胎工程技术成败的一项关键技术。

早期胚胎的体外培养涉及共培养体系、颗粒细胞、血清、生长因子、氨基酸、葡萄糖等诸多方面的因素,对这些因素的研究有助于提高早期胚胎的培养效果,为胚胎工程技术领域的深入研究奠定良好基础。

我国虽是水牛饲养的大国,但目前水牛的生产水平却很低,因此水牛品种改良亟待进行。体外受精技术的发展是水牛品种改良的重要途径,然而迄今有关水牛 IVF 技术的报道非常有限,本试验研究的主要内容是研究不同的添加物及培养系统对水牛早期胚胎体外发育的影响,通过这些影响胚胎体外发育的重要因素研究,确定合适的添加浓度,为不断改善牛早期胚胎培养液组分及培养系统提供科学的依据。

第二节 材料与amp;方法

2.1 材料

2.1.1 试验设备及用品

石英亚沸高纯水蒸馏器 江苏 SYZ-A型

高压灭菌锅 美国 SS-325型
电子天平 瑞士Mettler M240 型
渗透压测定仪 美国Friske M210 型
pH 值测定仪 中国奥立龙M868 型
实体显微镜 日本 Nikon

2.1.2 试验试剂及药品

TCM-199、必需氨基酸、非必需氨基酸 (GIBCO 公司), 促卵泡素 (中科院动物所), 发情牛血清、卵泡液 (自制), 胎牛血清 (杭州四季清公司), N, N, N', N', 一四甲基乙二胺 (购自上海生工生物工程技术有限公司)

其它药品均为Sigma公司产品

2.1.3 溶液的配制

2.1.3.1 卵巢保存及运输液

含有 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的生理盐水

2.1.3.2 卵母细胞收集液 (H-199)

TCM-199 并添加有20 mmol/L 的Hepes、5 mmol/L 碳酸氢钠、2% ECS 和 0.05 mg/mL 硫酸庆大霉素等配制而成。

2.1.3.3 成熟液 (M 液)

TCM-199+26.2 mmol/L $NaHCO_3$ +5 mmol/L Hepes+5% ECS+2% BFF+15 μ g/mL FSH

2.1.3.4 受精液 (F 液)

受精液为改良的Tyrode 培养液, 添加有0.6% BSA, 2.0 mmol/L 咖啡因, 20 μ g/mL 的肝素, pH 值为7.5~7.8, 渗透压为300 \pm 10 mosm。

2.1.3.5 胚胎培养液 (C 液)

TCM-199+10% FCS, SOFaa

2.1.3.6 胚胎冷冻液

TCM-199+1.8 mol/L 乙二醇+0.2 mol/L 的蔗糖+10% NBS

试验中所有培养液均添加60 mg/L 青霉素和100 mg/L 链霉素。所有试剂均

用孔径0.22 μm 的微孔滤膜过滤消毒。

2.1.3.7 样品缓冲液的配制

所用的样品缓冲液为1.0 mL 0.5 mol/L Tris-HCl (pH6.8) + 1.6 mL 10% SDS + 0.4 mL β -巯基乙醇 + 0.8 mL 甘油 + 0.2 mL 0.1% 溴酚蓝 + 双蒸水 4.0 mL, 终体积8 mL, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.1.3.8 聚丙烯酰胺凝胶的制备

(1) 丙烯酰胺单体贮液, 购自上海生工生物工程技术服务有限公司。

(2) 10% 过硫酸铵, 0.1 g过硫酸铵+1 mL 双蒸水。使用前新鲜配制。

(3) N, N, N', N', 一四甲基乙二胺 (N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine TEMED) 应用原包装液。

(4) 10% SDS, 25 g SDS用双蒸水溶解至250 mL。

(5) 浓缩胶缓冲液贮液 (0.5 mmol/L Tris-HCl, pH6.8)。

6.06 g Tris溶解在60 mL双蒸水中, 用1 mol/L盐酸调节pH至6.8, 再用双蒸水加至100 mL, 于4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

(6) 分离胶缓冲液贮液 (1.5 mmol/L Tris-HCl, pH 8.8)。

18.15 g Tris溶解在60 mL双蒸水中, 用1 mol/L盐酸调节pH至8.8, 再用双蒸水加至100 mL, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

(7) 浓缩电泳缓冲液 (5 \times)

15 g Tris, 72 g 甘氨酸, 5 g SDS, 用水溶解至1000 mL pH 8.3, 不必调节, 用时稀释5倍。

2.2 方法

2.2.1 颗粒细胞单层细胞的制备

体外成熟的卵丘-卵母细胞复合体经吸管轻轻反复抽打后, 将颗粒细胞收集起来, 用C液离心洗涤2次 (5 min, 1500 rpm), 第2次离心后所得的颗粒细胞用C液制成细胞密度为 $1\sim 2\times 10^6$ 个/mL 的悬浮液, 在60 \times 15 mm 的塑料培养皿中做成15 μL 的微滴, 并覆盖石蜡油。在38.5 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 和最大饱和湿度的培养箱中培养, 待颗粒细胞贴壁并开始生长, 即可使用。颗粒细胞单层细胞每2天换半液备用。

2.2.2 输卵管上皮细胞的培养

将从屠宰场采集的牛输卵管用生理盐水洗涤后剪开,用载玻片轻轻刮取管腔上皮细胞,经离心后所得的上皮细胞用C液制成细胞密度为 $1\sim 2\times 10^6$ 个/mL的悬浮液,在 60×15 mm的塑料培养皿中做成15 μ L的微滴,并覆盖石蜡油。在 38.5°C ,5% CO_2 和最大饱和湿度的培养箱中培养,4 d后即可形成单层细胞铺层,输卵管上皮细胞单层细胞每2天换半液备用。

2.2.3 血清的制备

用无菌针头和离心管从发情当天母牛颈静脉采血,静置30 min后放入 4°C 冰箱中过夜,待血清全部析出后,以3500 rpm离心10 min,吸取血清。再用同一转速将分离到的血清离心10 min,弃去沉淀。将血清在 56°C 水浴中灭活30 min。最后将灭活的血清过滤消毒,分装并保存于 -20°C 备用。

2.2.4 卵泡液(BFF)的制备

从黄牛卵巢表面2~8 mm的卵泡中抽取的卵泡液收集于离心管中,用3500 rpm离心10 min,弃去沉淀。不用灭活,直接用0.22 μ m滤器过滤灭菌,然后小剂量分装,于 -20°C 保存备用。

2.2.5 卵母细胞收集和体外成熟(IVM)

卵巢来自南宁周边的一个屠宰场。母水牛屠宰后尽快割下卵巢,立刻将其置于含有 $30\sim 35^{\circ}\text{C}$ 生理盐水的保温瓶内在4 h内送回实验室。卵巢送回实验室后,用剪刀剪去卵巢周边的多余组织,在烧杯中用 $30\sim 35^{\circ}\text{C}$ 的灭菌生理盐水至少洗2遍,再用70%的酒精冲洗1遍。然后,用10 mL的注射器和12号针头穿刺抽吸卵巢上面2~6 mm卵泡内的卵母细胞,在体视显微镜下挑选出具有完整卵丘细胞层或部分致密卵丘细胞的卵子,用洗卵液清洗2次后,再用成熟液洗2遍,然后放入含有1.5 mL成熟培养液的玻璃培养皿(20×10 mm)中,在 38.5°C ,5% CO_2 和最大饱和湿度的培养箱中进行体外成熟培养22~24 h。

2.2.6 体外受精(IVF)

2.2.6.1 精子的准备

本试验所用精液全部均来自广西区品改站的尼里400号公牛。细管冷冻精液在 37°C 水浴迅速解冻,剪去细管一端采集少许精液镜检精子活力,活力达标者进行精子洗涤。

精子洗涤采用上浮法。将活力良好的解冻精液注入到预先在 CO_2 培养箱中平衡过2 h以上的内含2 mL F液的离心管中,在 CO_2 培养箱内倾斜 45° 放置30-60 min,使离心管底部活力强的精子尽可能上浮至上层F液中。然后取出离心管,

吸取离心管上层含有精子的 F 液, 注入另一无菌离心管中, 再加入 2 mL F 液, 1500 rpm 离心 7-8 min, 弃掉上清液, 根据需要调整精液浓度。

2.2.6.2 受精

当卵母细胞成熟培养结束后, 用 1 mL 移液枪在成熟液中轻轻抽打卵母细胞以去掉大部分卵丘细胞, 经受精液洗涤 3 次后, 移入受精滴中。受精滴 (F 液) 为 50 μ L, 每滴放入 10~15 枚卵母细胞。将精子加到受精滴中, 使其终浓度达 $1\sim 2\times 10^6$ 个/mL, 在 39 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 最大空气湿度条件下孵育 8~10 h。

2.2.7 体外培养 (IVC)

受精后 18 h, 在受精滴中用吸管反复吹打假定的受精卵, 去掉卵丘细胞和附着的精子。将假定的受精卵从受精滴中吸出, 用培养液洗涤 3 遍后移入预先准备好的不同培养系统中, 在 38.5 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 和最大饱和湿度的培养箱中进行体外培养。

2.2.8 早期胚胎发育潜力的评定

将假设受精的卵子置入不同的培养系统中培养 48 h 后检查分裂情况, 每隔 48 h 半量换液, 受精后第 6~9 d 检查囊胚发育情况。分裂率的计算为分裂数除以用于受精的卵母细胞总数, 囊胚率的计算为囊胚数除以用于受精的卵母细胞总数。

2.2.9 早期胚胎发育质量的评定

2.2.9.1 胚胎细胞数

将体外培养获得的早期囊胚及孵化囊胚用 Hoechst33342 染色后在荧光显微镜下进行细胞计数。

2.2.9.2 胚胎冷冻及解冻

选体外受精后 6~8 d, 级别达到 1 或 2 级的囊胚用于冷冻。胚胎分级按“Manual of the International Embryo Transfer Society” Third Edition 的标准: 1 级为 Excellent or Good, 2 级为 Fair。

胚胎冷冻采用快速冷冻法, 简述如下, 将胚胎在含有防冻剂的 TCM-199 液中平衡 10 min 后, 装入 0.25 ml 的塑料细管中 (2~5 枚/支), 在冰箱平衡 2 h 后直接投入液氮。

胚胎在液氮中保存一定时间后, 从液氮取出在空气中停留 5~10 S, 而后投入 35 $^{\circ}$ C 的水浴中解冻。解冻后的胚胎直接在洗卵液中停留 10 min 除去防冻剂。胚

胎在培养液中清洗2次后,置于含有颗粒细胞单层细胞的微滴(20 μ L)中共培养6~8 h,观察其复苏情况。

2.2.9.3 早期胚胎蛋白质组分差异分析

按Laemmli(1990)方法进行蛋白质电泳。SDS-PAGE垂直平板胶大小为75 mm \times 85 mm \times 0.75 mm,分离胶浓度10%,浓缩胶浓度4%。电泳条件为:室温,电压100-120 V,电泳1.5 h。

2.2.10 试验设计

2.2.10.1 试验一 不同培养液成分对水牛体外受精早期胚胎发育及胚胎质量的影响

包括以下5个试验:

试验 1 胰岛素对水牛体外受精早期胚胎发育及胚胎质量的影响

本试验的目的是探讨在体外培养液中添加不同浓度的胰岛素对水牛体外受精早期胚胎发育的影响。将体外受精后的假定受精卵随机分成4组,即(1)不添加胰岛素的对照组,(2) TCM-199+0.5 μ g/mL胰岛素组,(3) TCM-199+5 μ g/mL胰岛素组,(4) TCM-199+50 μ g/mL胰岛素组,在39 $^{\circ}$ C, 5%CO₂空气条件下培养5~9d,①观察和记录受精后的囊胚数及发育情况;②统计囊胚的细胞数;③将囊胚进行冷冻及解冻,观察各组胚胎解冻后的发育情况,记录各组的囊胚发育率。

试验 2 葡萄糖对水牛体外受精早期胚胎发育的影响

本试验旨在探讨在受精后不同时间添加不同浓度的葡萄糖对水牛体外受精早期胚胎体外发育的影响。将受精后18 h的假定受精卵或96 h的胚胎随机分成6组,分别培养在6种葡萄糖浓度(0 mM、1.5 mM、3 mM、4.5 mM、6 mM和7.5 mM)的体外培养液中,在39 $^{\circ}$ C, 5%CO₂空气条件下培养,观察并记录受精后48 h和72 h时卵裂数(2-细胞数, 8-细胞数)、体外培养至6~8 d的囊胚数及囊胚细胞数。

试验 3 联合添加胰岛素和葡萄糖对水牛早期胚胎发育的影响

本试验旨在探讨在体外培养液中联合添加胰岛素和葡萄糖对水牛体外受精早期胚胎发育有何影响。将体外受精后的假定受精卵随机分成4组,即(1)不添加胰岛素和葡萄糖的TCM-199对照组,(2) TCM-199+Ins组,(3) TCM-199+Glu组,(4) TCM-199+Ins+Glu组,在39 $^{\circ}$ C, 5%CO₂空气条件下培养至6~8 d,观察并记录囊胚数及囊胚细胞数。

试验 4 胰岛素及葡萄糖对水牛胚胎蛋白质组分表达的影响

本试验的目的是了解胰岛素及葡萄糖对水牛胚胎蛋白质组分表达的影响的情况。将上述试验所得囊胚进行SDS-PAGE电泳, 观察蛋白质表达。

试验 5 非必需氨基酸和必需氨基酸对水牛早期胚胎发育的影响

本试验旨在探讨氨基酸和必需氨基酸对水牛体外受精早期胚胎发育、胚胎冷冻-解冻孵化效果及胚胎蛋白质组分的影响。将体外受精后的假定受精卵随机分成4组, 即(1)不添加非必需或必需氨基酸的对照组, (2)全程添加非必需氨基酸组, (3)全程添加必需氨基酸组, (4)先添加非必需氨基酸96 h后添加必需氨基酸组, 在39℃, 5%CO₂空气条件下培养至6~8 d, 分别进行以下研究: ①观察并记录囊胚数及囊胚细胞数; ②将囊胚进行冷冻-解冻后, 继续培养6~8 h, 观察孵化效果; ③将所得囊胚进行SDS-PAGE电泳, 观察蛋白质表达。

试验 6 肌醇和柠檬酸钠对水牛早期胚胎发育的影响

本试验旨在探讨肌醇和柠檬酸钠对水牛早期胚胎发育及胚胎蛋白质组分表达的影响。参照文献资料的浓度, 肌醇浓度为2.77 mM, 柠檬酸钠浓度为0.34 mM, 设两个组, 一个为对照组, 一个为添加肌醇和柠檬酸钠的组, 并观察记录分裂数及囊胚数。将上述试验所得囊胚进行SDS-PAGE电泳, 观察蛋白质表达。

2.2.10.2 试验二 不同培养系统对水牛体外受精早期胚胎发育及胚胎质量的影响

本试验的目的是比较不同培养系统对水牛体外受精胚胎的发育、胚胎冷冻-解冻孵化效果及胚胎蛋白质组分表达等影响。试验采用以TCM-199和SOFaa为基础液分别以输卵管上皮细胞及颗粒细胞为共培养体系进行胚胎的体外培养, 比较: ①受精后48 h的卵裂率、6~8 d的囊胚发育率及囊胚细胞数; ②优质胚胎进行冷冻-解冻后的存活率及囊胚孵化率; ③将所得囊胚进行SDS-PAGE电泳, 比较在不同培养系统培养下的囊胚蛋白质表达情况。

2.11 统计分析

数据采用SAS V6.12 版本软件进行X²检验。

第三节 试验结果

3.1 不同培养液成分对水牛体外受精早期胚胎发育及胚胎质量的影响

3.1.1 胰岛素对水牛体外受精早期胚胎体外发育及胚胎质量的影响

不同浓度的胰岛素对水牛卵母细胞体外受精早期胚胎发育及胚胎质量的比较,分别记录总囊胚率,囊胚细胞数及胚胎冷冻—解冻孵化率,加入的胰岛素的浓度分别为 0 $\mu\text{g/mL}$, 0.5 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 结果分别见表 3-1, 表 3-2, 表 3-3

表3-1 不同浓度的胰岛素对水牛卵母细胞体外受精早期胚胎发育的影响($\bar{x} \pm S \bar{x}$)

Table3-1 Effect of different concentration of insulin on buffalo early embryo development

处理组 ($\mu\text{g/mL}$)	卵母细 胞数	重 复	总囊胚 率(%)	占囊胚总数的百分比			
				Proportion of total blastocysts			
Treatment	No.	NO.	% Bla.	D5(%)	D6(%)	D7(%)	D8(%)
	oocytes						
0	283	10	27.21 ^A	5.10 \pm 2.66 ^a	44.16 \pm 3.8 ^a	29.87 \pm 1.98 ^a	20.78 \pm 3.56 ^a
0.5	286	10	33.22 ^B	11.58 \pm 1.59 ^b	41.05 \pm 1.42 ^a	28.42 \pm 3.56 ^a	18.95 \pm 1.78 ^a
5	296	10	41.22 ^C	15.57 \pm 3.16 ^b	42.62 \pm 1.87 ^a	25.41 \pm 4.07 ^a	16.39 \pm 1.51 ^a
50	302	10	34.77 ^B	15.24 \pm 2.74 ^b	42.86 \pm 4.65 ^a	26.67 \pm 3.08 ^a	18.75 \pm 3.02 ^a

注: 列内不同字母之间表示差异显著($P < 0.05$)。

由表 3-1 所显示的结果得知, 水牛体外受精早期胚胎在添加有不同浓度(0 $\mu\text{g/mL}$, 0.5 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$)的胰岛素的培养液中培养, 总囊胚率分别为 27.21%, 33.22%, 41.22%, 34.77%, 其中以浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ 的添加组为最高, 对照组为最低, 两者相差 14.01 个百分点, 两者间差异极显著 ($P < 0.01$), 与其他浓度组之间差异显著 ($P < 0.05$); 从胚胎发育速度来看, 添加胰岛素组的胚胎发育速度较对照组快, 第 5 天的囊胚发育率与对照组差异显著 ($P < 0.05$)。

表 3-2 胰岛素对水牛卵母细胞体外受精胚胎囊胚细胞数的影响($\bar{x} \pm S \bar{x}$)

Table 3-2 Effect of insulin on cell number of early buffalo embryo derived from IVF

处理组($\mu\text{g/mL}$)	早期囊胚细胞数	孵化囊胚细胞数
Treatment	Cell NO.of early Bla.	Cell NO.of hatch Bla.
0	73.21 \pm 5.91 ^a (20)	164.29 \pm 11.11 ^a (18)
0.5	78.19 \pm 3.62 ^{ab} (31)	170.62 \pm 6.97 ^{ab} (24)
5	84.69 \pm 7.17 ^b (25)	176.32 \pm 8.53 ^b (17)
50	77.90 \pm 4.04 ^{ab} (27)	173.64 \pm 8.88 ^{ab} (20)

注：列内不同字母之间表示差异显著性($P < 0.05$)。

由表 3-2 所显示的结果得知，添加不同浓度胰岛素后，水牛卵母细胞体外受精早期囊胚细胞数分别为 73.21 vs 78.19 vs 84.69 vs 77.90，以浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ 时为最高，与对照组差异极显著 ($P < 0.01$)，与其他浓度组差异显著 ($P < 0.05$)；孵化囊胚细胞数分别为 164.29 vs 170.62 vs 176.32 vs 173.64，添加胰岛素的各组与对照组差异显著 ($P < 0.05$)，而各添加组之间差异不显著 ($P > 0.05$)。

表 3-3 胰岛素对水牛卵母细胞体外受精早期胚胎冷冻 - 解冻孵化效果的影响

Table 3-3 Effect of insulin on survival rate of frozen-thawed buffalo embryos derived from IVF

处理组	冷冻数	回收数	形态正常率(%)	囊胚复苏率(%)	孵化囊胚率(%)
Treatment	No. embryos	No.reclaim	% morphological normal	% Blastocysts	% hatch Blastocysts
TCM-199	54	53	90.57	67.92 ^a	39.62 ^a
TCM-199+Ins.	68	66	89.39	69.70 ^a	48.83 ^b

注：列内不同字母之间表示差异显著($P < 0.05$)。

由表 3-3 所显示的结果得知，胰岛素对水牛卵母细胞体外受精早期胚胎冷冻及解冻效果的影响，在囊胚复苏率(67.92% vs 69.70%)上没有显著性差异 ($P > 0.05$)，然而在孵化囊胚率上(39.62% vs 48.83%)有显著影响 ($P < 0.05$)。

3.1.2 葡萄糖对水牛体外受精早期胚胎体外发育的影响

试验一 不同浓度的葡萄糖对水牛过8-细胞期的影响，分6组浓度进行比较，即0 mM, 1.5 mM, 3 mM, 4.5 mM, 6 mM, 7.5 mM, 结果见表3-4:

表3-4 受精后18 h添加不同浓度的葡萄糖对水牛过8-细胞期的影响

Table 3-4 Effect of glucose supplemented 18h after insemination on 8-cell buffalo embryo derived from IVF

处理组 (mM)	卵母细胞数	重复数	≥2cell(48h)(%)	≥8cell(96h)(%)
Treatment	No.oocytes	No.	% cleaved	% cleaved
0	106	10	52.83 ^a	40.57 ^a
1.5	126	10	53.97 ^a	39.68 ^a
3	102	10	51.96 ^a	42.16 ^a
4.5	116	10	50.86 ^a	39.66 ^a
6	110	10	40.91 ^b	27.27 ^b
7.5	108	10	26.85 ^c	15.74 ^c

注：列内不同字母之间表示差异显著($P < 0.05$)。

由表3-4所显示的结果得知，当加入葡萄糖的浓度在0—4.5mM之间的时候，对水牛胚胎通过2-8细胞期（52.82% vs 53.97% vs 51.97% vs 50.86%，40.57% vs 39.68% vs 42.16% vs 39.66%）没有显著性影响($P > 0.05$)，当浓度加到6 mM以上时，水牛胚胎通过2—8细胞期的比例明显降低，而且浓度越高影响越大（40.91% vs 26.85%，27.27% vs 15.74%）($P < 0.05$)，与浓度为0—4.5mM的各组（40.91%、26.85% vs 52.83%、53.97%、51.97%、50.86%，27.27%、15.74% vs 40.57%、39.68%、42.16%、39.66%）之间有显著性差异($P < 0.05$)。

试验二 在受精后18 h和96 h添加不同浓度的葡萄糖对水牛早期胚胎发育的影响，加入的葡萄糖浓度为0 mM，1.5 mM，3 mM，4.5 mM，6 mM，7.5 mM，结果见表3-5：

表3-5 在受精后18 h和96 h添加不同浓度的葡萄糖对水牛早期胚胎发育的影响($\bar{x} \pm S \bar{x}$)

Table 3-5 Effect of glucose supplemented 18h and 96 h after insemination on buffalo early embryo derived from IVF

加入时间 Time	浓度 (mM) Concentration	卵母细 胞数 No.	重 复 No.	囊胚率 (%) % Bla.	孵化囊胚 率 (%) % hatch Bla.	早期囊胚细胞数 No. early cell	孵化囊胚细胞数 No.hatch Bla.cell
受精后18h	0	106	10	30.19 ^c	18.87 ^{bc}	74.33±2.01 ^a (14)	163.21±7.35 ^a (21)
	1.5	126	10	28.57 ^c	22.22 ^c	72.89±1.77 ^a (20)	158.97±2.43 ^a (24)
	3	102	10	28.43 ^c	19.61 ^{bc}	68.45±3.48 ^a (18)	162.47±5.44 ^a (13)
	4.5	116	10	30.17 ^c	20.69 ^c	71.56±5.32 ^a (11)	165.35±3.28 ^a (14)
	6	110	10	9.01 ^a	1.80 ^a	0 (0)	0 (0)
	7.5	108	10	3.70 ^a	0 ^a	0 (0)	0 (0)
受精后96h	0	116	10	31.03 ^c	21.55 ^c	69.54±2.11 ^a (12)	159.26±5.25 ^a (14)
	1.5	118	10	27.97 ^c	22.03 ^c	73.66±1.49 ^a (19)	160.75±8.94 ^a (17)
	3	124	10	29.03 ^c	19.35 ^{bc}	70.87±2.99 ^a (17)	163.12±7.34 ^a (20)
	4.5	110	10	32.73 ^c	22.73 ^c	71.29±3.24 ^a (15)	161.19±2.37 ^a (21)
	6	108	10	18.52 ^c	13.15 ^b	69.48±3.78 ^a (14)	160.91±3.66 ^a (16)
	7.5	102	10	20.59 ^b	10.78 ^b	72.59±4.55 ^a (15)	158.51±1.58 ^a (14)

注：列内不同字母之间表示差异显著(P<0.05)。

由表 3-5 所显示的结果得知，在水牛体外受精早期胚胎培养过程中，无论在哪个时间加入葡萄糖，当其浓度大于 6 mM 时都显著的影响水牛早期胚胎发育到囊胚及孵化囊胚的阶段 (P<0.05)，囊胚率及孵化囊胚率都低于浓度小于 6 mM 的各浓度组；但是浓度在 0—4.5mM 之间时，不管加入的时间如何，对其囊胚的发育没有显著性影响 (P>0.05)；加入不同浓度的葡萄糖对早期囊胚细胞数和孵化囊胚数没有显著性影响 (P>0.05)。

试验三 联合添加胰岛素和葡萄糖对水牛早期胚胎发育的影响，结果见表 3-6:

表 3-6 联合添加胰岛素和葡萄糖对水牛早期胚胎发育的影响 ($\bar{x} \pm S \bar{x}$)

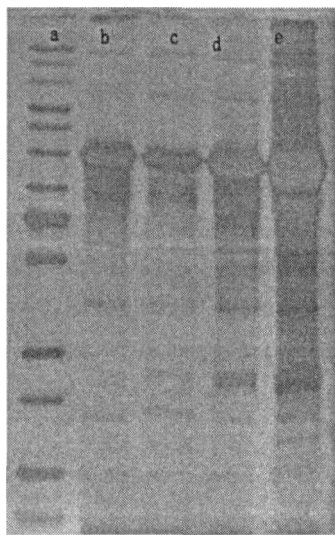
Table 3-6 Effect of insulin and glucose on early buffalo embry developmen

处理组 Treatment	卵母细胞数 No.oocytes	重复 No.	孵化囊胚率 (%) % hatch Bla.	总囊胚率 (%) % Bla.	早期囊胚细胞数 No.early Bla cell	孵化囊胚细胞数 No.hatch Bla.cell
对照	283	10	21.20 ^a	27.92 ^a	74.34±5.91 ^a (20)	164.29±11.11 ^a (18)
Ins	296	10	20.27 ^a	41.22 ^b	84.69±7.17 ^b (25)	176.32±8.53 ^b (16)
Glu	210	10	20.69 ^a	30.17 ^a	71.56±5.32 ^a (27)	165.35±3.28 ^a (14)
Ins+Glu	230	10	30.43 ^b	40.00 ^b	94.74±2.55 ^c (21)	189.01±1.22 ^c (17)

注：各组均以 TCM-199 为基础液，列内不同字母之间表示差异显著 ($P < 0.05$)。

由表 3-6 所显示的结果得知，联合添加胰岛素和葡萄糖组与对照组、单独添加胰岛素组、单独添加葡萄糖组在孵化囊胚率上差异显著 (30.43% vs 21.20% vs 20.27% vs 20.69%) ($P < 0.05$)，联合添加胰岛素和葡萄糖组与对照组、单独添加葡萄糖组在总囊胚率上差异显著 (40.00% vs 27.92% vs 30.17%) ($P < 0.05$)，与单独添加胰岛素组在总囊胚率上差异不显著 (41.22% vs 40.00%) ($P > 0.05$)；联合添加胰岛素和葡萄糖组能显著增加早期囊胚的细胞数 (74.34 vs 84.69 vs 71.56 vs 94.74) 和孵化囊胚的细胞数 (164.29 vs 176.32 vs 165.35 vs 189.01) ($P < 0.05$)。

试验四 胰岛素和葡萄糖对水牛卵母细胞体外受精早期胚胎蛋白质组分表达的影响，结果见图3-1：



本试验所使用的分子量
Marker 由上至下的分子量为
116.0KDa,66.2KDa,45.0KDa,
35.0KDa,25.0KDa,18.4KDa.
MBI Fermentas 公司产品
a 分子量 Marker
b TCM-199
c TCM-199+Ins
d TCM-199+Glu
e TCM-199+Ins+Glu

图3-1 加入胰岛素，葡萄糖后水牛卵母细胞体外受精早期胚胎蛋白质SDS-PAGE电泳图谱

Figure 3-1 Diagram of SDS-PAGE of buffalo embryo protein (silver stain)

由图3-1所显示的结果得知，添加胰岛素，葡萄糖后对水牛卵母细胞体外受精早期胚胎蛋白质组分表达条带没有影响，各蛋白质表达基本一致。

3.1.3 非必需氨基酸和必需氨基酸对水牛早期胚胎发育的影响

试验一 非必需氨基酸和必需氨基酸对水牛早期胚胎发育的影响，本试验参考文献资料确定添加非必需氨基酸及必需氨基酸的浓度，即培养液中必需氨基酸和非必需氨基酸添加量分别为2% (V/V)和1% (V/V)结果见表3-7:

表3-7 非必需氨基酸和必需氨基酸对水牛早期胚胎发育的影响($\bar{x} \pm S \bar{x}$)

Table 3-7 Effect of NEAA and EAA on early buffalo embryo developmen

处理组 Treatment	卵母细 胞数 No. oocytes	重复 No.	卵裂率 (%) % Cleaved	总囊胚率 (%) % Blastocysts	早期囊胚 细胞数 No.early Bla.cell	孵化囊胚 细胞数 No.hatch Bla.cell
对照	179	10	50.28 ^b	28.49 ^b	71.23±4.56 ^a (18)	157.93±9.24 ^a (17)
NEAA	184	10	51.09 ^b	11.41 ^a	69.78±3.23 ^a (24)	159.57±3.46 ^a (19)
EAA	193	10	23.32 ^a	10.36 ^a	72.55±5.11 ^a (21)	160.71±6.45 ^a (23)
NEAA+(96h)EAA	187	10	49.20 ^b	36.90 ^c	68.47±3.67 ^a (19)	163.74±4.82 ^a (20)

注：各组均以TCM-199为基础液，列内不同字母之间表示差异显著(P<0.05)。

由表3-7所显示的结果得知，在水牛卵母细体外受精早期胚胎培养中，整个培养阶段都添加必需氨基酸的组与对照组、全程添加非必需氨基酸组、分阶段添加氨基酸组在卵裂率上差异显著(23.32% vs 50.28%、51.09%、49.20%) (P<0.05)；分阶段添加氨基酸组在总囊胚率上与其他各组间差异显著(36.90% vs 28.49% vs 36.90% vs 10.36%) (P<0.05)；在早期囊胚的细胞数(71.23 vs 69.78 vs 72.55 vs 68.47)和孵化囊胚细胞数(157.93 vs 159.57 vs 160.71 vs 163.74)上各组间没有显著性差异(P>0.05)。

试验二 非必需氨基酸和必需氨基酸对水牛早期胚胎冷冻—解冻孵化效果的影响, 结果见表3-8:

表3-8 非必需氨基酸和必需氨基酸对水牛早期胚胎冷冻-解冻孵化效果的影响

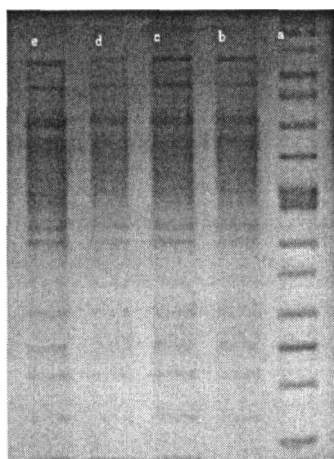
Table 3-8 Effect of NEAA and EAA on survival rate of frozen-thawed buffalo embryos derived from IVF

处理组	冷冻数	回收数	形态正常率(%)	囊胚复苏率(%)	囊胚孵化率(%)
Treatment	No.embryos	No.reclaim	% morphological normal	% Blastocysts	% hatch Blastocysts
对照	24	24	91.67	67.67 ^a	37.50 ^a
NEAA	17	17	88.24	68.59 ^a	47.06 ^b
EAA	20	20	90.00	65.00 ^a	45.00 ^b
NEAA+(96h)EAA	18	18	88.87	77.78 ^b	50.00 ^b

注：列内不同字母之间表示差异显著(P<0.05)。

由表3-8所显示的结果得知，在水牛卵母细胞体外受精早期胚胎培养中，未添加氨基酸组，全程加入氨基酸与分阶段添加氨基酸的组之间在冷冻解冻后的囊胚发育率上差异显著（67.67%、68.59%、65.00% vs 77.78%）(P<0.05)，对照组与全程加入氨基酸之间在冷冻解冻后的囊胚发育率上差异不显著（67.67% vs 68.59% vs 65.00%）(P>0.05)；对照组与全程加入氨基酸组，分阶段添加氨基酸组在冷冻解冻后的孵化囊胚率上差异显著（37.50% vs 47.06%、45.00%、50.00%）(P<0.05)，全程加入氨基酸组与分阶段添加氨基酸组之间在冷冻解冻后的孵化囊胚率上差异不显著(P>0.05)。

试验三 非必需氨基酸和必需氨基酸对水牛体外受精胚胎蛋白质组分表达的影响，结果见图3-3：



本试验所使用的分子量 Marker
由上至下的分子量为
116.0KDa.66.2KDa.45.0KDa.35.
0KDa.25.0KDa.18.4KDa.MBI
Fermentas 公司产品
a 分子量 Marker
b TCM-199
c TCM-199+NEAA
d TCM-199+EAA
e TCM-199+NEAA+(72h)EAA

图3-2 加入NEAA和EAA后水牛卵母细胞体外受精早期胚胎蛋白质SDS-PAGE电泳图谱

Figure 3-2 Diagram of SDS-PAGE of buffalo embryo protein (silver stain)

由图3-2所显示的结果得知，添加非必需氨基酸和必需氨基酸后对水牛卵母

细胞体外受精早期胚胎蛋白质组分表达没有影响，各蛋白质表达量基本一致。

3.1.4 肌醇和柠檬酸钠对水牛体外受精早期胚胎体外发育的影响

试验一 肌醇和柠檬酸钠对水牛体外受精早期胚胎体外发育的影响，按参考文献资料加入的肌醇浓度为 2.77 mM，柠檬酸钠浓度为 0.34 mM。结果见表 3-9:

表 3-9 肌醇和柠檬酸钠对水牛体外受精早期胚胎体外发育的影响

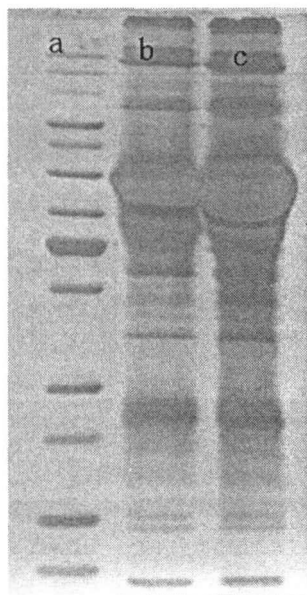
Table 3-9 Effect of inositol and sodium citrate on early buffalo embryo development

处理组 Treatment	卵母细胞数 No.oocytes	重复数 No.	卵裂率 (%) % Cleaved	总囊胚率 (%) % Blastocysts
TCM-199	168	10	51.19 ^a	27.98 ^a
TCM-199+肌醇+柠檬酸钠	179	10	65.36 ^b	32.96 ^a

注：列内不同字母之间表示差异显著 ($P < 0.05$)。

由表 3-9 所显示的结果得知，在水牛卵母细胞体外受精早期胚胎培养中，添加柠檬酸钠和肌醇的一组跟对照组在卵裂率 (51.19% vs 65.36%) 上差异显著 ($P < 0.05$)，总囊胚率 (27.98% vs 32.96%) 之间差异不显著 ($P > 0.05$)。

试验二 肌醇和柠檬酸钠对水牛卵母细胞体外受精早期胚胎蛋白质组分表达的影响，结果见图3-3:



本试验所使用的分子量
Marker 由上至下的分子量为
116.0KDa,66.2KDa,45.0KDa,
35.0KDa,25.0KDa,18.4KDa.
MBI Fermentas 公司产品
a 分子量 Marker
b TCM-199
c TCM-199+肌醇+柠檬酸钠

图3-3 加入肌醇和柠檬酸钠后水牛卵母细胞体外受精早期胚胎蛋白质SDS-PAGE电泳图谱

Figure 3-3 Diagram of SDS-PAGE of buffalo embryo protein (silver stain)

由图3-3所显示的结果得知，添加肌醇和柠檬酸钠后对水牛卵母细胞体外受精早期胚胎蛋白质组分表达没有影响，各蛋白质表达一致。

3.2 不同培养系统对水牛体外受精早期胚胎体外发育及胚胎质量的影响

试验一 不同培养系统对水牛体外受精早期胚胎体外发育的影响, 结果见表 3-10:

表 3-10 不同培养系统对水牛体外受精早期胚胎体外发育的影响 ($\bar{x} \pm S \bar{x}$)

Table 3-10 Effect of different IVF system on early buffalo embryo development

处理组 Treatment	卵母细胞数 No.oocytes	重复数 No.	卵裂率(%) % Cle.	总囊胚率 (%) % Bla.	早期囊胚细胞数 No.early cell	孵化囊胚细胞数 No.hatch cell	
TCM-199	对照	257	10	31.13 ^a	14.00 ^{ab}	75.50±2.11 ^b (16)	161.97±3.76 ^b (16)
	Ovi.	288	10	54.86 ^{cd}	30.21 ^{de}	70.46±2.33 ^{ab} (24)	157.23±1.65 ^b (19)
	Cum.	276	10	52.17 ^c	31.16 ^{de}	76.30±1.25 ^b (27)	163.37±1.05 ^b (25)
	Cum.+ Ovi.	297	10	41.75 ^b	18.52 ^{ab}	74.78±3.07 ^b (21)	165.50±0.77 ^b (20)
SOFaa	对照	234	10	61.97 ^e	17.95 ^{ab}	61.57±4.22 ^a (15)	123.76±9.33 ^a (13)
	Ovi.	220	10	65.91 ^e	25.45 ^{cd}	66.38±5.01 ^{ab} (22)	118.45±4.91 ^a (19)
	Cum.	240	10	67.08 ^e	26.25 ^{de}	64.12±2.89 ^{ab} (26)	122.11±5.77 ^a (20)
	Cum.+Ovi.	256	10	64.45 ^e	19.53 ^{bc}	62.67±3.45 ^a (20)	120.34±8.34 ^a (18)

注: 列内不同字母之间表示差异显著($P < 0.05$)。

由表 3-10 所显示的结果得知, 在水牛卵母细胞体外受精早期胚胎培养中, 以 TCM-199 为基础培养液, 单独与输卵管上皮细胞或颗粒细胞共培养, 在卵裂率, 总囊胚率上与对照组和同时跟两种细胞进行培养的组之间有显著性差异($P < 0.05$), 而单独与输卵管上皮细胞或颗粒细胞共培养时, 两组在卵裂率和总囊胚率上差异不显著($P > 0.05$); 以 SOFaa 为基础培养液, 单独和输卵管上皮细胞或颗粒细胞共培养时, 在卵裂率, 总囊胚率上与对照组和同时跟两种细胞进行培养的组他们之间没有显著性差异($P > 0.05$), 单独与输卵管上皮细胞或颗粒细胞共培养时, 两组在卵裂率和总囊胚率上差异不显著($P > 0.05$); 相同的共培养细胞, 不同的基础培养液在卵裂率和孵化囊胚细胞数上有显著性差异($P < 0.05$), 在总囊胚率和早期囊胚细胞数上没有显著性差异($P > 0.05$)。

试验二 不同培养系统对水牛体外受精早期胚胎冷冻—解冻孵化效果的影

响，结果见表 3-11:

表3-11不同培养系统对水牛体外受精早期胚胎冷冻-解冻孵化效果的影响

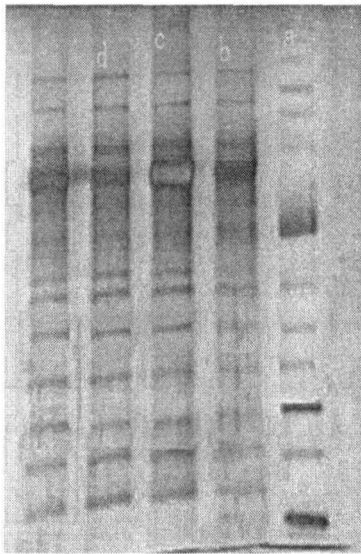
Table 3-11 Effect of different IVF system on survival rate of frozen-thawed buffalo embryos derived from IVF

处理组 Treatment	冷冻数 No. embryos	回收数 No. reclaim	形态正常率(%) % morphological normal	囊胚复苏率(%) %.Blastocysts	孵化囊胚率(%) %.hatch Blastocysts	
TCM-199	对照	20	20	18	65.00 ^{bc}	30.00 ^{bc}
	Ovi.	10	10	9	70.00 ^{cd}	40.00 ^d
	Cum.	20	20	20	70.00 ^{cd}	35.00 ^{cd}
	Cum.+Ovi.	25	24	23	75.00 ^d	33.33 ^c
SOPaa	对照	23	22	21	59.09 ^{ab}	23.08 ^a
	Ovi.	28	27	25	62.96 ^{ab}	29.63 ^{bc}
	Cum.	21	20	18	57.14 ^a	25.00 ^{ab}
	Cum.+Ovi.	24	23	17	56.52 ^a	26.09 ^{ab}

注：表内不同字母之间表示差异显著 ($P < 0.05$)。

由表 3-11 所显示的结果得知，当基础培养液相同，不同共培养系统的胚胎冷冻解冻后囊胚复苏率和孵化的囊胚率各组间差异不显著 ($P > 0.05$)。而当共培养细胞相同时，不同培养基培养的胚胎在冷冻解冻后囊胚复苏率和孵化的囊胚率上差异显著 ($P < 0.05$)。

试验三 不同培养系统对水牛体外受精胚胎蛋白质组分表达的影响，结果见图 3-4，图 3-5:

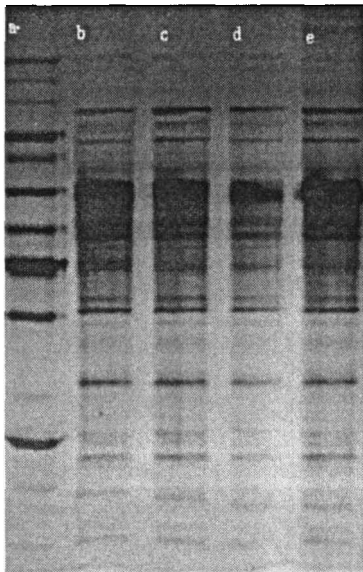


本试验所使用的分子量
Marker 由上至下的分子量为
116.0KDa.66.2KDa.45.0KDa.
35.0KDa.25.0KDa.18.4KDa.
MBI Fermentas 公司产品
a 分子量 Marker
b TCM-199
c TCM-199 +Cum.
d TCM-199+ Ovi.
e TCM-199+ Cum.+ Ovi.

图3-4 水牛卵母细胞体外受精早期胚胎在以TCM-199为基础培养液的不同共培养系统中培养的蛋白质SDS-PAGE电泳图谱

Figure 3-4 Diagram of SDS-PAGE of buffalo embryo protein (silver stain)

由图3-4所显示的结果得知，以TCM-199为基础培养液的不同共培养系统对水牛卵母细胞体外受精早期胚胎蛋白质组分表达没有影响，各蛋白质表达一致



本试验所使用的分子量
Marker 由上至下的分子量为
116.0KDa.66.2KDa.45.0KDa.
35.0KDa.25.0KDa.18.4KDa.
MBI Fermentas 公司产品
a 分子量 Marker
b SOFaa
c SOFaa +Cum.
d SOFaa + Ovi.
e SOFaa + Cum.+ Ovi.

图3-5 水牛卵母细胞体外受精早期胚胎在以SOFFaa为基础培养液的不同共培养系统中培养的蛋白质SDS-PAGE电泳图谱

Figure 3-5 Diagram of SDS-PAGE of buffalo embryo protein (silver stain)

由图3-5所显示的结果得知，以SOFFaa为基础培养液的不同共培养系统对水牛卵母细胞体外受精早期胚胎蛋白质组分表达没有影响，各蛋白质表达一致。

第四节 分析与讨论

4.1 胰岛素对水牛体外受精早期胚胎体外发育及胚胎质量的影响

胰岛素能促进细胞 DNA、RNA、蛋白质和脂类合成, 调节质膜、酶和细胞核的功能。转铁蛋白有益于铁的转运而与细胞结合, 减轻早期胚胎代谢产生的毒性金属离子的积累。但有关胰岛素影响哺乳动物体外受精早期胚胎发育的比较少, 在小鼠方面研究得比较多, 小鼠早期胚胎发育过程中, 除了基本的能量代谢外, 还需要有多种因子的参与。胰岛素与其受体或胰岛素样生长因子 1 受体 (IGF1-R) 结合促进细胞生长。Rappolee 等^[130]与 Kapur 等^[131]在小鼠子宫腔液中检测到 Ins 的存在, 但 Doherty 等发现小鼠早期胚胎不能合成胰岛素^[132]。对患糖尿病大鼠或胰岛素分泌破坏小鼠模型的研究发现, 其胚胎退化率增加^[133, 134]。提示胰岛素作为母源性因子, 与相关受体结合后, 可影响胚胎发育。本试验探讨了不同浓度的胰岛素对水牛早期胚胎发育的影响, 发现当浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ 时, 不管是总囊胚率还是囊胚的细胞数显著的高于其他组 ($P < 0.05$)。并且胰岛素的加入能影响胚胎冷冻—解冻后囊胚的孵化率, 其原因在于, 囊胚的细胞数是影响胚胎抗冻性的一个因素, 加入胰岛素后, 囊胚的细胞数增加了, 因此其抗冻能力也相应提高。在对添加胰岛素的早期胚胎进行蛋白质 SDS-PAGE 电泳时, 发现胰岛素的加入也没有影响胚胎的蛋白质表达, 与白照岱等研究结果相似。但随着浓度的加大囊胚发育状况较差, 与 De Hertogh 等^[135]结果类似, 提示浓度过大反而抑制早期胚胎的发育。有研究证明胰岛素能促进兔囊胚发育, 并能提高囊胚细胞增殖^[136]。本实验结果与之基本一致。此外, 在试验中也同时发现, 加入胰岛素能加快胚胎的发育, 第 5 天就出现早期囊胚。由此可见, 5 $\mu\text{g/mL}$ 胰岛素能促进水牛早期胚胎的发育, 能增加囊胚的细胞数, 增强其抗冻能力。

4.2 葡萄糖对水牛体外受精早期胚胎体外发育的影响

培养液中添加胚胎代谢的能量底物是必不可少的, 常见的是葡萄糖、丙酮酸和乳酸。近年来研究发现, 对不同动物的胚胎、不同发育时期, 这些能量底物的作用也不相同。多数研究认为葡萄糖对大部分哺乳动物的早期胚胎发育有害, 这一现象在牛^[56]、绵羊^[58]、仓鼠^[55]和人^[59]等得到证实。然而葡萄糖对稍后的胚胎发育则显得十分重要。为了确定合适的葡萄糖浓度及验证这一结论, 本试验将体外受精 18 h 的受精卵分别放入含有不同浓度的葡萄糖的 TCM-199 中与体外受精 96 h 后再放入含有不同浓度的葡萄糖的 TCM-199 中进行培养, 结果发现当加入葡萄糖的浓度在 0-4.5 mM 之间的时候, 对水牛胚胎通过 2-8 细胞期没有显著性差异 ($P > 0.05$), 当浓度加到 6 mM 以上时, 水牛胚胎通过 2-8 细胞期的比例明显

降低,与对照组之间有显著性差异($P < 0.05$)。有研究报道,在8-细胞以前,低浓度的葡萄糖(1.5 mM)可促进细胞的分裂,而本试验发现葡萄糖浓度在0-4.5 mM之间时,对水牛胚胎通过2-8细胞期的比例没有影响,而当浓度过高时(> 6 mM),则影响水牛胚胎通过2-8细胞期,原因可能在于,本试验使用的是与颗粒细胞共培养的培养系统,颗粒细胞可能分泌某些物质降低高浓度的葡萄糖给胚胎造成的影响,而当葡萄糖浓度大到一定范围后,颗粒细胞分泌的物质不足以抵制高浓度的葡萄糖时就出现阻碍胚胎的发育的现象。这也表明了葡萄糖对8-细胞前胚胎的发育具有一定的抑制作用,它通过增加细胞中氧基的含量,从而抑制胚胎的发育。本试验在受精96 h后加入不同浓度的葡萄糖,发现葡萄糖浓度在0-6 mM水牛早期胚胎发育到囊胚及孵化囊胚的阶段没有显著影响($P > 0.05$),但如果高于6 mM则影响囊胚的发育,添加葡萄糖对囊胚的细胞数没有显著的影响。试验得出在TCM-199中添加葡萄糖不能促进水牛体外胚胎发育。尽管牛胚胎在2-细胞期已经获得了葡萄糖的代谢能力,但又是8-细胞后胚胎发育不可缺少的能量物质。为观察磷酸盐/葡萄糖对牛胚胎的影响Plmyopummintr等^[59]实验设计了HECM一种简单的化学培养液培养受精卵,结果在HECM, HECM+葡萄糖, HECM+磷酸盐, HECM+葡萄糖+磷酸盐中第8 d,发育到致密桑椹胚的百分率分别为21.2%, 29.2%, 26.5%, 各组间没有差异,其细胞核平均数量上也没有差异(桑椹期27-32,囊胚期99-130);第8天发育到囊胚期的百分率分别为9.9%, 11.1%, 14.3%, 5.7%,表明葡萄糖+磷酸盐的培养及对囊胚的发育均有不利的影响。Kim等^[119]在半确定成分的培养液中观察牛体外胚胎不同发育阶段对葡萄糖的需要,在有葡萄糖、丙酮酸、乳酸内培养,结果2-细胞胚胎在完全缺乏能量基质下表现发育,乳酸、丙酮酸单独或结合用可支持8-细胞发育;丙酮酸对于支持发育到桑椹期是需要的,而葡萄糖单独或与乳酸、丙酮酸一起合用则抑制了8-细胞发育到桑椹期。在培养全过程或在受精后48 h、96 h加入葡萄糖5.56 mM则抑制胚胎发育,而在受精后96 h加入5.56 mM葡萄糖,提高了囊胚和扩展囊胚的发育,表明能量基质对于在化学成分更明确的条件下培养牛胚胎是需要的,葡萄糖对牛胚胎发育的影响取决于发育时期。而本试验没有得到类似结果,其原因可能在于,本试验室使用的是复杂的共培养系统,该系统可能含有些碳水化合物,这些物质有可能取代葡萄糖进行能力代谢,从而抑制了胚胎利用葡萄糖的代谢途径。因此,如果要验证葡萄糖是否能促进体外受精胚胎囊胚的形成,需要在成分明确的胚胎培养系统中进行。

在培养液中添加低浓度的葡萄糖时囊胚发育率及囊胚细胞数与对照组均无显著差异。可见葡萄糖的添加并没有明显改善水牛早期胚胎发育状况。而用胰岛素加葡萄糖的培养液培养水牛早期胚胎,孵化囊胚率显著高于胰岛素和葡萄糖单独添加组和对照组($P < 0.05$),总囊胚率显著高于葡萄糖单独添加组和对照

组 ($P < 0.05$), 与单独添加胰岛素组差异不显著 ($P > 0.05$), 早期囊胚细胞数和孵化囊胚细胞数显著高于胰岛素和葡萄糖单独添加组和对照组 ($P < 0.05$)。可见, 于含胰岛素的培养液中添加葡萄糖大大提高了胰岛素对囊胚发育的促进效应。Matsui 等用葡萄糖和胰岛素的 mSOF + AA 培养基从囊胚期开始培养牛早期胚胎, 发现囊胚细胞数显著提高^[117]。以上研究提示, 胰岛素可能通过刺激葡萄糖的吸收利用, 调节胚胎代谢而加快囊胚发育。以往对小鼠^[138, 139]、猪^[140]早期胚胎研究证明, 胰岛素可刺激胚胎蛋白质合成而促进其发育。本实验证实, 胰岛素不仅刺激胚胎蛋白质合成, 而且能促进胚胎细胞分裂增殖和葡萄糖的吸收利用, 加快囊胚发育进而改善早期胚胎发育状况。

对水牛体外受精卵在添加了胰岛素及葡萄糖的培养液中培养得到得囊胚采用 SDS-PAGE 单向电泳, 再经银染显带, 对其蛋白质变化进行分析, 结果表明, 添加了胰岛素及葡萄糖后并不影响水牛胚胎蛋白质得表达。

4.3 非必需氨基酸和必需氨基酸对水牛早期胚胎发育的影响

氨基酸是生物体内的基本结构单位, 除了可以组成蛋白质的肽链和通过代谢影响细胞生长外, 还可以作为渗透压剂、pH 缓冲剂、重金属螯合剂以及能量底物起作用。氨基酸也是许多生理调节物的前体, 如 NO、多胺等^[141]。牛^[142]、小鼠^[143]、兔^[144]和绵羊^[145]的输卵管液和子宫液检测发现, 其中含有一定比例的游离氨基酸, 特别是含有一定浓度的非蛋白质氨基酸。同时胚胎本身也有一定的氨基酸储存在胞质中的氨基酸池内, 所以氨基酸对体内胚胎的发育有非常重要的作用。在体外, 氨基酸同样对胚胎发育有很大的促进作用。在培养系统中添加氨基酸, 能够有效地提高体外受精卵的囊胚发育率, 孵化率以及囊胚的细胞数^[142], 氨基酸除了用于合成蛋白质外, 还可以作为渗透剂, 细胞间的缓冲剂, 重金属的螯合剂以及能量底物, 氨基酸也是众多生理调节物的前体。本试验参考文献资料来添加非必需氨基酸及必需氨基酸, 即培养液中必需氨基酸和非必需氨基酸添加量分别为 2% (V/V) 和 1% (V/V)。结果发现: 必需氨基酸对受精卵的分裂有影响, 在胚胎培养早期加入必需氨基酸的卵裂率显著低于对照组, 全程添加非必需氨基酸组及分阶段添加氨基酸组 ($P < 0.05$), 整个培养阶段都添加氨基酸组在囊胚率上都显著的低于分阶段添加氨基酸组 ($P < 0.05$)。而在囊胚的细胞数上各组间没有显著性差异 ($P > 0.05$), 这与资料结果基本相似, 有研究表明 Eagle 氏非必需氨基酸和必需氨基酸在胚胎不同发育阶段的作用不同。胚胎致密化之前, 必需氨基酸没有作用, 但对后期囊胚的发育有促进作用, 主要表现在增加内细胞团分裂率和植入后胎儿的发育能力。非必需氨基酸和谷氨酰胺对致密化后期胚胎的发育也有利, 能促进胚胎向囊胚的发育和胚泡的形成, 并增加滋养层细胞数量和囊胚的孵化能力。但本试验没有得到囊胚细胞数增加的结果, 其原因可能

在于, 资料所示的试验的基础培养液是 SOFaa 液, 有资料显示胚胎在其内发育后囊胚的细胞数比在以 TCM-199 为基础液的培养液少, 而本试验是以 TCM-199 为基础培养基, 对照组是 TCM-199, 所以没有得到囊胚细胞数增加的结果。

对加入氨基酸的囊胚进行冷冻—解冻试验的时候发现, 对照组, 全程加入氨基酸与分阶段添加氨基酸组的胚胎在冷冻解冻后的囊胚发育率分别为 67.67%, 68.59%, 65.00%, 77.78%, 前三组跟第四组间差异显著 ($P < 0.05$), 前三组之间差异不显著。孵化囊胚率分别为 37.50%, 47.06%, 45.00%, 50.00%, 第一组与后三组间差异显著 ($P < 0.05$), 而后三组间差异不显著。说明分阶段加入不同的氨基酸对囊胚的抗冻性有明显的改善。囊胚的抗冻性可能与脂滴多少有关, 李荣凤^[146]证实, 利用添加氨基酸的培养系统可以明显减少囊胚中的脂滴大小及数量, 提高囊胚的抗冻性。

4.4 肌醇和柠檬酸钠对水牛体外受精早期胚胎体外发育的影响

肌醇及其代谢中间物是细胞信号传导系统的重要成份, 肌醇三磷酸具第二信使功能, 而肌醇的一些代谢物直接具有促有丝分裂的效应。柠檬酸可刺激脂肪酸的合成, 同时它又可以作为金属离子 Ca^{2+} 的螯合剂, 使细胞间紧密连接开放, 从而增加细胞间溶质穿梭运输。因此柠檬酸对于保持细胞连接的完整性, 从而对桑椹胚及囊胚的形成具有重要意义。本试验所加肌醇和柠檬酸钠的浓度参考文献资料, 结果显示添加柠檬酸钠和肌醇的一组与对照组在卵母细胞分裂率 (51.19% vs 65.36%) 差异显著 ($P < 0.05$), 囊胚率 (27.98% vs 32.96%) 之间差异不显著 ($P > 0.05$)。这与资料显示结果不一致, 其原因可能在于, 本试验用的培养液加入了 10% 的新生牛血清 (NBS), 而血清中还有高浓度的肌醇和柠檬酸钠, 这些量可能已经满足了胚胎对肌醇及柠檬酸钠的需求, 本试验所加入的肌醇和柠檬酸钠的浓度是参考文献资料, 因为每个实验室的培养条件不一样, 所以还需进一步研究其合适的浓度。

4.5 颗粒细胞对牛卵母细胞及早期胚胎体外培养的影响

体细胞与卵母细胞及早期胚胎的共培养是模仿胚胎体内发育条件、提高牛卵母细胞和早期胚胎体外培养效果的有效方法, 用于共培养系统的细胞类型较多, 有颗粒细胞、输卵管上皮细胞、子宫内膜细胞等等。Rieger D 等^[147]采用输卵管上皮细胞单层与牛早期胚胎共培养, 明显促进了牛早期胚胎的发育, 使胚胎发育到囊胚的时间比对照组提前 24 h 而且提高了囊胚细胞的数量, 此外, 共培养系统的培养液在培养过程中降低了培养液中的葡萄糖浓度, 提高了乳酸含量, 究其原因可能是细胞单层在与早期胚胎共培养过程中产生一些活性因子, 这些因子使培养液中的组分发生了转化, 除去了培养液环境中抑制胚胎发育的成份, 从而在一

一定程度上减少了早期胚胎发育中不利底物(如葡萄糖)对胚胎发育的阻滞作用与不良影响,维持了胚胎的正常发育;也有人认为这些因子(如生长因子 IGF1, IGF2)可能是通过透明带通道,与早期胚胎表面受体结合,从而发挥其生物学效应,实现了对早期胚胎发育的调控。本研究对比了输卵管上皮细胞,颗粒细胞与牛体外受精胚进行共培养,发现不管培养基如何,输卵管上皮细胞,颗粒细胞都能显著促进胚胎的发育 ($P < 0.05$),但输卵管上皮细胞与颗粒细胞对胚胎发育的促进作用没有显著差异 ($P > 0.05$)。这表明输卵管上皮细胞和颗粒细胞都可以分泌一些因子来促进胚胎的正常发育,但目前还不能确定颗粒细胞分泌的一些因子为何种物质。胚胎在相同基础培养基中分别与输卵管上皮细胞和颗粒细胞共培养时,其囊胚在囊胚的细胞数及抗冻能力上没有显著差异。说明共培养系统没有对囊胚的质量产生影响。

胚胎在相同的共培养系统不同的基础培养液中培养的结果显示,以TCM-199为基础培养液的共培养系统与以SOFaa为基础培养液的培养系统卵裂率和孵化囊胚细胞数上有显著性差异 ($P < 0.05$),在总囊胚率和早期囊胚细胞数上没有显著性差异 ($P > 0.05$),在胚胎的抗冻性上都显著高于以SOFaa为基础培养基的培养系统。很多研究表明,在TCM-199中培养得到的胚胎质量优于SOFaa,特别在其囊胚的细胞数及冷冻—解冻后的孵化效果上。TCM-199中含有很多能促进细胞增值的成分,而SOFaa相对来说成分较明确,虽然跟体细胞共同培养,但还是会缺少某些物质,氨基酸的添加仍不能使用SOF培养的胚胎的冷冻解冻存活率提高至TCM-199的水平,可见,胚胎冷冻解冻后存活能力的提高需要多种物质来共同完成,任何成份的缺乏都可能影响到胚胎的发育质量,从而影响胚胎的冷冻解冻存活能力。

很多研究表明,在SOFaa中的囊胚发育率比在TCM-199中的高,本试验没有得到此结果,原因可能在于本试验室用的气象环境是在 39°C ,5% CO_2 ,最大空气湿度条件下,而SOFaa是适合的气象环境是在5%的 CO_2 ,5%的 O_2 ,90%的 N_2 ,饱和湿度中。

本试验还对在TCM-199和SOFaa中发育的胚胎进行SDS-PAGE单向电泳,再经银染显带,对其蛋白质变化进行分析,结果发现其蛋白质的表达没有差异。

第五节 结论

- 5.1 浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胰岛素能促进水牛体外受精早期胚胎的发育。
- 5.2 在 TCM-199 中单独添加葡萄糖是不必要的, 联合添加葡萄糖和胰岛素能促进水牛体外受精早期胚胎的发育。
- 5.3 受精后加入非必需氨基酸 96 h 后加入必需氨基酸能促进水牛早期胚胎的发育。
- 5.4 添加肌醇和柠檬酸钠水牛体外受精早期胚胎发育没有显著影响。
- 5.5 以 TCM-199 为基础液的共培养系统是胚胎最佳的培养体系。

参考文献

- [1] 陈大元主编.受精生物学—受精机制与生殖工程.北京:科学出版社,2000.
- [2] Trounson A.et al.Current Status of IVMIVF and Embryo Culture in humans and farm animals.Theriogenology, 1994,41:57-66.
- [3] 刘红林,范必勤.哺乳动物卵母细胞的体外成熟[J].畜牧与兽医,1996,4:180-183.
- [4] Martino A.et al. Influence of the collection technique of prepubertal goat oocytes on in vitro maturation and fertilization [J].Theriogenology, 1994, 42:859-873.
- [5] 王亚光,段恩奎主编.山羊胚胎工程,天则出版社.
- [6] Austin CR. Observation of the penetration of sperm into mammalian egg. Aust JRes,1951, B4:581-596.
- [7] Thibault C,Dauzier L,Winterberges S.Etude cytologique de la fécondation in vitro de l'oeuf de lapine C.R.Soc Biol Paris,1954,148:780-790.
- [8] Chang M C.Fertilization of rabbit ova in vitro.Nature,1959,184:466-467.
- [9] Yanagimachi R, Chang MC.Fertilization of hamster eggs in vitro.Nature,1963,200:281-282.
- [10] Whittingham DG..Fertilization of mouse egg in vitro.Nature (lond),1968,592-593.
- [11] HannerCE,JenningsLL,Sojka NJ.Cat(Felis catus)spermatozoa required capacitation.Reprod Fert,1970,23:477-480.
- [12] Yanagimachi R.Fertilization of quinea pig eggs in vitro.Anat Rec, 1972,174:9-20.
- [13] Pickworth S,Yerganian G,Chang MC.Fertilization and early development in the Chinese hamster cricetus griseus.Anat Rec,1968, Oct:197-208
- [14] Noske IG..In vitro fertilization of the Mongolian gerbil egg.Experientia,1972 Nov 15, 28(11):1348-1350.
- [15] Gould KG..Application of in vitro fertilization.Fed Proc, 1973,Oct, 32(10),2069-74.
- [16] MiyamotoH.Chang MC.Fertilization of rat eggs in vitro.BiolReprod,1973 Nov,9(4):384-93.
- [17] Mahi CA,Yanagimachi R.Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes in vitro[J]. Exp Zool,1976 May,196(2):189-96.
- [18] Niwa k,Iritani A.Effect of various hexoses on sperm capacitation and penetration of rat eggs in vitro[J].Reprod Fert,1978 Jul,53(2):267-71.
- [19] Hanada A,Chang MC.Penetration of the zona-free or intact eggs by foreign spermatozoa and the fertilization of deer mouse eggs in vitro[J].Exp Zoo,1978 Feb,203(2):277-85.
- [20] Kreitmann O,Bayard F,Hodgen GD.17 beta-Hydroxy steroid dehydrogenase in monkey endometrium during the menstrual cycle and at the time of implantation.Steroids,1980

- Sep,36(3):365-72.
- [21] Gould KG.Ovum recovery and in vitro fertilization in the chimpanzee.Fertil steril,1983 Sep,40(3):378-83.
- [22] Steptoe PC,Edwards RG.Birth after the reimplantation of human embryo.The lancet, 1978, 2:880-882.
- [23] Hunter RHF.Sperm:egg ratios and putative molecular signals to modulate gamete interactions in polytocous mammals.Mol Reprod Dev,1993,35:324-327.
- [24] Brackett BG,Bousquet D,Boice ML,et al.Normal development following in vitro fertilization in the cow.Biol Reprod,1982,27:147-158.
- [25] Cheng WTK,Moor R M and Polge C.In vitro fertilization of pig and sheep oocytes matured in vivo and vitro.Theriogenology,1986,25:146.
- [26] Mattioli M,Bacci G and seren E.Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized in vitro.Theriogenology,1989,31:1201-1207.
- [27] 钱菊汾,郝志明,张涌.奶山羊精子体外获能与体外受精.西北农业大学学报,1992,20(增刊):113-117.
- [28] 段恩奎,王亚光,马保华等.奶山羊精子体外获能异体受精试验.西北农业大学学报,1990,18(2):102-104.
- [29] 刘灵,钱菊汾,张涌.奶山羊精子体外获能与体外受精试验.农业科学集刊,1993,1:365-368.
- [30] 冯怀亮著.哺乳动物胚胎工程.吉林科学技术出版社,1994,147-149.
- [31] Brackett BG,Bousquet D,Boice ML,et al.Normal development following in vitro fertilization in the cow.Biol Reprod,1982, Aug,27(1):147-58.
- [32] Lu K H,Macdonnell HF and Gordon I.Birth of calves after in vitro maturation and fertilization of follicular oocytes.Theriogenology,1989,31:222(Abstr).
- [33] 旭日干.“试管家畜”生产技术及其应用前景.生物学通报,1989,10:1-3.
- [34] 范必勤.我国哺乳动物繁殖生物技术研究与应用现状.1991,7(6):8-13.
- [35] 陶涛,朱裕鼎.奶牛胚胎分割和移植的研究.山东农业大学学报,1991,22(11):11-16.
- [36] 阳年生,卢克焕.玻璃化冷冻保存牛体外受精胚胎.广西农业大学学报,1992,11(3):102-107.
- [37] 谭景和,秦鹏春.胚胎显微操作技术进展及存在问题.东北农学院学报,1992,23(3):300-305.
- [38] 石德顺.牛的胚胎工程技术.广西农业大学学报,1992,A12:121-124.
- [39] Manda ML,Singla SK,Jaikhani S,et al.In vitro fertilization in buffalo and birth of first ever IVF buffalo calf.Proceedings III World Buvalo Congress. VArna BulQaria,1991,11-17.

- [40] 蒋和生,石德顺,韦英明等.水牛体外受精技术研究的建立.中国农业科学,1994,4:89.
- [41] 江金益,熊慧卿.水牛体外受精研究[J].江苏农业学报,1990,6(3):25-30.
- [42] 谭世俭,李庄.激光辐照水牛精液对体外受精效果影响[J].激光生物学报,1998,7(2):158.
- [43] 谭世俭,阳年生.现行牛 IVF 程序在水牛体外受精的应用研究[J].广西农业大学学报,1998,17(4):312-317.
- [44] 李青,阳年生.成熟培养时间对水牛卵母细胞体外成熟的影响[J].广西农业生物科学,1999,18(2):117-119.
- [45] 尚江华,刘云海等.添加 β -巯基乙醇对水牛胚胎体外发育的影响[J].草食家畜,2001,(3):28-31.
- [46] 王启胜,牛树理等.BOEC+CCs,TAURIN 对水牛卵母细胞体外受精及早期胚胎发育的影响[J].中国草食动物,2001,3(4):3-5.
- [47] 黄右军,黄芬香等.水牛卵母细胞体外受精及早期胚胎发育的研究[J].中国畜牧杂志,2002,38(4):10-12.
- [48] 王启胜,牛树理.水牛与黄牛卵母细胞的回收及体外成熟.体外受精比较[J].中国畜牧杂志,2002,38(5):33-34.
- [49] 谢英,单天锡等.水牛卵母细胞体外成熟研究[J].西南农业学报,2004,17,(3):382-385.
- [50] 谢英,单天锡等.水牛附睾尾精子的体外受精[J].中国兽医学报,2004,20(3):190-192.
- [51] 黄右军,杨炳壮等.试管水牛技术研究[J].广西畜牧兽医,2004,20(3):109-111.
- [52] AbdulRahmanSESAY,石德顺.不同促精子活动剂对水牛卵母细胞体外受精及随后胚胎发育的影响[J].华南农业大学学报,2005,26(2):95-99.
- [53] 黄海鹏,黄锋.中国水牛科学技术发展回顾与展望.第五界亚洲水牛大会论文集,2006.
- [54] Madan ML,Singla SK,Manik RS.In vitro production and transfer of embryos in buffalos.Theirogenology,1994,41:139-143.
- [55] Schin SA,et al.Two-cell block to development of culture hamster embryos is catted by phosphate and glucose.Biol Reprod [J],1988,39(4):1184-1192.
- [56] Rackett BG,luelke KA. Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos [J].Tberigenology,1993,39:43-64.
- [57] Petters RM, Johnson BH,Reed ML,et al.Glucose, glutamine, and in organic phosphate in early development of the pig embryo in vitro [J].Reprod Fert,1990,89:144-149.
- [58] 曾卫.提高动物胚胎体外培养的研究进展[J].国外医学计划生育分册,1997,16(3):144-149.
- [59] Cbatet CL,Ziomek CA,Bavister BD, et al. An improved culture medium supports development of random-bred-cell mouse embryos in intro [J].Reprod Fert,1989,86:679-688.

- [60] 张靖飞,李裕强,刘月凤.动物胚胎体外培养研究进展[J].动物科学与动物医学,2002,19(2):19-22.
- [61] Ludwig T E,Lane M,Bavister BD.Different in culture [J].Biolo Reprod,2001,64:1366-1374.
- [62] Spindle AI,Pedersen RA.Hatching attachment and outgrowth of mouse blastocyst in intro[J].Gxp Zool,1993,186:305-318.
- [63] Lane M,Gardner DK.Mouse embryo development is differentially regulated by amino acids[J].Reprod Fertil,1997,109:153-164.
- [64] Gardner DK.Changes in requirement and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture [J].Bioscience Reports,1985,5:393-400.
- [65] Nensbolme A,Crazbtree EA,Ardawi B.MSM:The role of high rules of glycolysis and glutamine utilization in rapidly dividing cells[J].biosciences,1985,5:393-400.
- [66] Casslen BG.Free amino acides in human uterine fluid possible role of hightaurine concentration [J].Reprod Med,1987,32:181-184.
- [67] Mouses DF,Matkovic M,Cabrera Fisher E, et al. Amino acids contents of sheep oriductal and uterine fluids [J].Tberigenology,1997,47:336.
- [68] Miller JGO,Scbultz GA.Anime acid content of preimplantation rabbit embryos and fluids of the reproductive tract [J].Biol.Reprod,1987,36:125-129.
- [69] Lane M,Gardner DK.Mouse embryo development is differentially regulated by amino acids[J].Reprod Fertil,1997,109:153-164.
- [70] Gardner DK.Changes in requirement and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture [J].Bioscience Reports,1985,5:393-400.
- [71] M.L.reed 等.猪胚胎的体外培养[J].郭年藩译,国外畜牧科技,1992,19(14):16-18.
- [72] Walker SK et al.Theriogenology,1992,37(37):111-126.
- [73] 曹旺聚.绵羊胚胎体外培养条件的研究进展[J].国外畜牧科技,1996,23(5):27-30.
- [74] 甜万强等.哺乳动物早期胚胎体外培养各细胞阶段营养需求研究.中国农学通报,2005,21(3):37-40.
- [75] Mattioli M.Concentration of cAMP during the maturation of pig oocytes in vivo and in vitro [J].Journal of Reproduction and Fertility,1994,100:403-409.
- [76] Watson AJ,Hogan A,Hahnel A,et al.Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation bovine embryo [J].Molecular Reproduction and Development,1992a,31:87-95.
- [77] Watson AJ,Wierner KE,Arcellana-Panlilio M,et al. U2 small nuclear RNA localization and expression during bovine preimplantation development [J].Molecular Reproduction

- and Development,1992b,31:231-240.
- [78] 叶荣等.哺乳动物早期胚胎发育阻滞的产生与克服.黑龙江畜牧兽医,2004,16(1):62-64.
- [79] Biggers J D. Development of mouse embryos in organ cultures of fallopian tubes on achemically defined medum [J].Nature,1998,194:747-749.
- [80] Chatot CL,Bavister BD.An improved culture medium supports development of random 2 bred 12-cell mouse embryos in vitro [J].Reprod Fert,1989,86:679-688.
- [81] Chatot CL,Lewis JL,Torres I,et al.Development of 12-cell embryos from different strains of mice in CAB medium[J].Biol Reprod,1990,42:432-440.
- [82] Schini SA,Bavister BD.Two cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose [J].Biol Reprod,1988,39:1183-1192.
- [83] Bavister BD.Role of oviductal secretions and embryonic growth in vivo and in vitro [J].Theriogenology,1988,29:143-154.
- [84] hatot CL,Lewis JL,Torres I et al. Development of 1-cell embryos from different strains of mice in CZB medium [J].Biology of Renroduction,1990,42:432-436.
- [85] Larson RC, Ignatz GG, Currie WB.Transforming growth factor beta and basic fibroblast growth factor synergistically promote early embryo development during the fourth cell cycle [J].Molecular Reproduction and Development,1992b,33:432-435.
- [86] 王海滨,夏国良,李美玲等.哺乳动物卵母细胞培养体系的研究进展[J].农业生物技术学报,2000,8(3):297-310.
- [87] Paria BC, Dey SK.Preimplantion embryo development in vitro:co-operation intraction among embryo and role of growth factors.Proc Natl Acad Sci,1990,87:4756-4760.
- [88] Wood SA,Kaye PL.Effects of epidemal growth factor on preim-plantation mouse embryo [J]. Reprod Fertil,1989,85:575-582.
- [89] Gardner HG,Kaye PL.Insulin incrases cell numbers and morphological development in mouse preimplantation embryo in vitro.Reprod Fertil Dev,1991,3:79- 91.
- [90] DeChiara TM,Efstratiadis A,Robertson EJ.A growth Deficiency phenotype in heterozygousmice carrying an insulin-like growth factor-II gene disrupted by targeting.Nature,1990,345:78-80.
- [91] Larson RC,Ignatz GG,Currie WB.Define medium containing TGF-P and PFGF permits development of bovine embryo beyond the "8-cell block"[J].Reprod Fert Abstr,1990,5: 16.
- [92] Too BS,Iim MK,Na YJ,et al. The mechanism of action of co-culture on embryo development in the mouse model:direct embryo-to-cell contact and the removal of deleterious components.Fertil Steril,2001,75:193- 199.
- [93] Gardner DK,Lane M,Spitzer A,et al. Enhanced rates of cleavage and deveopment for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage in vitro in the absence of senrm and somatic

- cells:amino acids,vitamin and culturing embryo in groups stimulate development.Bial
Reprod,1994,50:390- 400.
- [94] Rclnnan N,Colline AR,Suh TK,et al. Development of IVM- IVFproduced 8-cell bovine embryos in simple, serum-free:media after conditioning or co-culture with buffalo rat liver cells.Mol Reprod Dcr,1994,38:251-255.
- [95] Benjamin G,Brackett.Analysis of factors involved in the vitro production of bovine embryos [J].Theriogenology,1993,39: 43-64.
- [96] Eyestone WH.Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviducal tissue or in conditioned medium [J].Journal of Reproduction and Fertility,1989,85: 715-720.
- [97] Van Inzen W G.Culture of bovine embryos to the blastocyst stage using Buffalo Rat Liver (BRL) cells [J].Theriogenology,1995,723-738.
- [98] Lane M,Gardner D K.Effect of incubation volume and embryo density on the development and viability of mouse embryos in vitro [J].Human Reproduction,1992,7:558-562.
- [99] Mermillod P,Vansteenbrugge A,Wils C,et al. Characterization of the embryotrophic activity of exogenous protein-free oviduct-conditioned medium used in culture of cattle embryos [J].Biology of Reproduction,1993,49(3):582-587.
- [100] Roblero LS,Guadarrama A,Ortiz ME,et al. High potassium concentration and the cumulus corona oocyte complex stimulate the fertilizing capacity of human spermatozoa [J].Fertility and Sterility,1990,54:328-332.
- [101] Bowman P,McLaren A.Cleavage rate of mouse embryos in vivo and in vitro [J].Journal of embryology and experimental morphology,1970,24 (1):203-207.
- [102] Thompson JG,Mcnaughton C,Gasparrini,et al. Effect of inhibitors and uncouplers of oxidative phosphorylation during compaction and blastulation of bovine embryos cultured in vitro [J].Journal of Reproduction and Fertility,2000,118(1):47-55.
- [103] Harvey AJ,Kind KL,Thompson JG.REDOX regulation of early embryo development [J].Reproduction,2002,123(4):479-486.
- [104] Butcher L,Martin KL.The effect of glucose on the early bovine embryos [J].Biology of Reproduction,1998,56:954-956.
- [105] Rose-Hellekant TA,Libersky-Williamson EA,Bavister BD.Energy substrates and amino acids provided during in vitro maturation of bovine oocytes alter acquisition of developmental competence [J].Zygote,1998,6(4):285-294.
- [106] Van Winkle LJ,Haghighat N,Campione AL.Glycine protects preimplantation mouse conceptuses from a detrimental effect on development of the inorganic ions in oviducal fluid [J].Journal of Experimental, 1990,253(2):215-219.
- [107] Rieger D,Luciano A M.The effects of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on the metabolic activity, nuclear maturation and subsequent development of

- cattle oocytes in vitro [J].*Journal of Reproduction and Fertility*,1998,112:123-130.
- [108] Herrler A, Lucas Hahn A and Niemann. Effects of insulin-like growth factor 1 on in vitro production of bovine embryos [J].*Theriogenology*,1992,37:1213-1224.
- [109] Palma GA and Berm G. Effect of growth factors IGF-1, IGF-2, EGF and PDGF on development of in vitro produced bovine blastocysts [J].*Theriogenology*,1995,43:291-296.
- [110] Iwata H, Ohota M, Hashimoto S, et al. Stage-specific effect of growth hormone on developmental competence of bovine embryos produced in-vitro [J].*Journal of Reproduction and Development*, 2003, 49(6): 493-499.
- [111] Lane M, Baltz JM, Bavister BD. Regulation of intracellular pH in hamster preimplantation embryos by the sodium hydrogen antiporter [J].*Biology of Reproduction*, 1998,59:1483-1490.
- [112] Umaoka Y, Noda Y, Narimoto K, et al. Effect of oxygen toxicity on early development of mouse embryos [J].*Molecular Reproduction and Development*,1992,31:28-32.
- [113] Fukui Y, Pugh PA and Teruit HR. Factors affecting the in vitro development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized in vitro [J].*Journal of Reproduction and Fertility*,1991,92:125-131.
- [114] Lim J M, and Hansel W. Exogenous substances affecting development of in vitro-derived bovine embryos before and after embryonic genome activation [J].*Theriogenology*,2000,53:1081-1091.
- [115] Dematos DG, Fumus CC, Moses DF, et al. Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured in vitro [J].*Molecular Reproduction and Development*,1995,42(4):432-436.
- [116] Azambuja RM, Kraemer DC and Westhusin E. Effect of low temperatures on in vitro matured bovine oocytes [J].*Theriogenology*,1998,49:1155-1164.
- [117] Rocha A, Randel RD, Broussard JR, et al. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos Taurus* but not in *bos indicus* cows [J].*Theriogenology*, 1998,49:657-665.
- [118] Plante L, King W A. Light and electron microscopic analysis of bovine embryos derived by in vitro and in vivo fertilization [J].*Assisted Reproduction and Genetics*,1994,11(10):515-529.
- [119] King W A, Linares T, Gustavsson I. Cyto—genetics of preimplantation embryos sired by bulls heterozygous for the 1 / 29 translocation [J].*Hereditas*,1981,94(2):219-224.
- [120] King W A. Intrinsic embryonic factors that may affect survival after transfer [J].*Theriogenology*,1985,23:161-174.
- [121] Iwasaki S, Nakahara T. Cell number and incidence of chromosomal anomalies in bovine blastocysts fertilized in vitro followed by culture in vitro or in vivo in rabbit

- oviducts[J].Theriogenology,1990,33:669-675.
- [122] Megowm L T et al. 1993, Proc. Aust,Soc.Reprod.Biol,25:60 abstra.
- [123] TervitH R et al.1994,Thermgeno / ogy,41:315.
- [124] J Kei lmai et al.1995,JMamm Om.Res,12(1):S3.
- [125] 刘林,安民,朱金宝等.兔核移植胚胎蛋白质变化的电泳分析.遗传学报,1995,4:259-263.
- [126] Khatir H,Lonergan P,Touze J-L,et al. The characterization of bovine embryos obtained from prepubertal calf oocytes and their viability after non-surgical embryo transfer. Theriogenology,1998,50:1201-1210.
- [127] Chung K.S, Kim J.h,Seung K.R,et al.Development and outgrowth of mouse embryos in Whitten's medium supplemented with human amniotic fluid(hAF).Theriogenology, 1995,43(1):187.
- [128] Williams J.H,Moss GE,Hunnicut L.K,et al.Induction of the heat shock response and translational thermotolerance in day 15 ovine trophectoderm.Theriogenology,1997, 47(5):1125-1139.
- [129] Cecconi Sandra,Rossi Ganna,et al. Presence of a 31-KD protein band in human cumulus-coronaradiata-conditioned media and pregnancy outcome.Fertility and Sterility, 2001,75(5):966-972.
- [130] Rappolee DA, Werb Z.The role of growth factors in early mammalian development [J]. Adv Dev,1994,4 (1):411.
- [131] Kapur S,Tamada H,Dey SK,et al. Expression of insulin-2 like growth factor-2I (IGF-2I) and its receptor in the periimplantation mouse uterus,and cell-2 specific regulation of IGF-2I gene expression by estradiol and progesterone [J].Biol Reprod,1992,46 (2):208-219.
- [132] Doherty AS,Temeles GL,Schultz RM.Temporal pattern of IGF-2I expression during mouse preimplantation embryogenesis [J].Mol Reprod Dev,1994,37 (1):21-26.
- [133] Lea RG,McCracken J E.McIntyre SS,et al.Disturbed development of the preimplantation embryo in the insulin-2 dependent diabetic BB/ E rat[J].Diabetes,1996,45 (11):1463-1470.
- [134] Rehak P,Mihalik J,Vesela J,et al. Effects of impaired maternal insulin secretion on preimplantation embryo development in ICR mice[J].Physiol Res,1996,45 (6):453-458.
- [135] De Hertogh R,Vanderheyden I,Pampfer S,et al.Stimulatory and inhibitory effects of glucose and insulin on rat blastocyst development in vitro[J].Diabetes,1991,40 (5):641-647.
- [136] Herrler A,Krusche CA,Beier HM.Insulin and insulin—like growth factor2 promote rabbit blastocyst development and prevent apoptosis[J].Biol Reprod,1998,59 (6):1302-1310.
- [137] Matsui M,Takahashi Y,Hishinuma M,et al.Stimulatory effects of insulin on the

- development of bovine embryos fertilized in vitro [J]. *Vet Med Sci*, 1995, 57 (2): 331-336.
- [138] Harvey MB, Kaye PL. Insulin stimulates protein synthesis in compacted mouse embryos [J]. *Endocrinology*, 1988, 122 (3): 1182-1184.
- [139] Harvey MB, Kaye PL. Insulin increases the cell number of the inner cell mass and stimulates morphological development of mouse blastocysts in vitro [J]. *Development*, 1990, 110 (3): 963-967.
- [140] Lewis AM, Kaye PL, Lising R, et al. Stimulation of protein synthesis and expansion of pig blastocysts by insulin in vitro [J]. *Reprod Fertil Dev*, 1992, 4 (1): 119-123.
- [141] Gardner DK, Land M, Spitzer A, et al. Enhance 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 culture in embryos in group stimulate development. *Biol Reprod*, 1994, 50: 390-400.
- [142] Takahashi Y and First N L. In vitro development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acid and vitamins. *Theriogenology*, 1992, 37: 963-978.
- [143] Gardner DK and Leese H J. Concentration of nutrients in mouse oviductal fluid and their effect on embryo development and metabolism in vitro. *Reprod Fertil*. 1990, 88: 361-368.
- [144] Miller J G O and Schultz GA. Amino Acid content of preimplantation rabbit embryos and fluids of the reproductive tract. *Biol Reprod*, 1987, 36: 125-129.
- [145] Moses D F, Matkovic M, Cabrera E, Fisher and Martinez AG. Amino acid contents on sheep oviductal and uterine fluids. *Theriogenology*, 1997, 47(1): 336.
- [146] 李荣凤, 细江实佐. 牛体外受精胚胎抗冻性原因初探. *中国农业科学*, 2002, 35 (9) : 1125-1129.
- [147] Rieger D, Grisart B, Semple E, et al. Comparison of the effects of oviductal cell co-culture and oviductal cell-conditioned medium on the development and metabolic activity of cattle embryos. *J Reprod Fertil*, 1995, Sep, 105(1): 91-8.

附录

英文缩写	中文对照
AI	人工授精
BSA	牛血清白蛋白
BFF	牛卵泡液
CCs	颗粒细胞
CDM	培养液
COC	卵丘细胞—卵母细胞复合体
EAA	必需氨基酸
ECS	发情牛血清
EDTA	乙二胺四乙酸
FBS	胎牛血清
FGF	表皮生长因子
FSH	促卵泡素
G	葡萄糖
Gln	谷氨酰胺
GH	生长激素
I	胰岛素
IGF	胰岛素类生长因子
IVC	体外培养
IVF	体外受精
IVM	胰岛素
LH	促黄体素
MgO	肌醇
NBS	新生牛血清
NEAA	非必需氨基酸
OCS	发情牛血清
PDGF	血小板生长因子
SDS-PAGE	十二烷基硫酸钠—聚丙烯酰胺凝胶
SOD	超氧歧化酶
SOF	合成输卵管液
TGF	转化生长因子
V _B	维生素 B
V _C	维生素 C
V _E	维生素 E

图片与说明

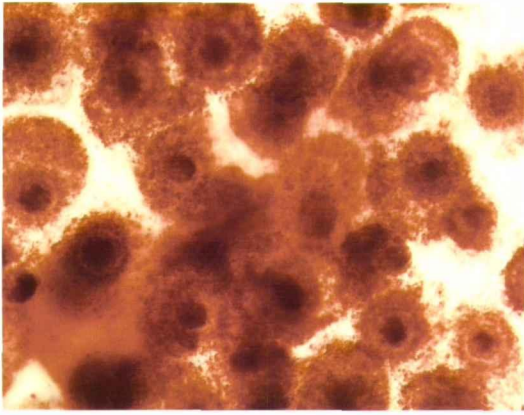


图 1 成熟的卵母细胞(100×)

Figure1 mature oocyte

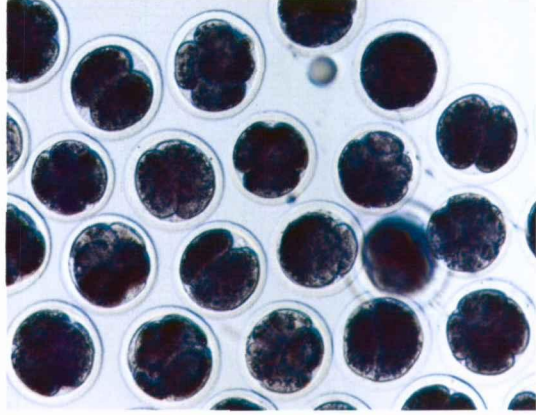


图 2 2-4 细胞(100×)

Figure2 2-4cells

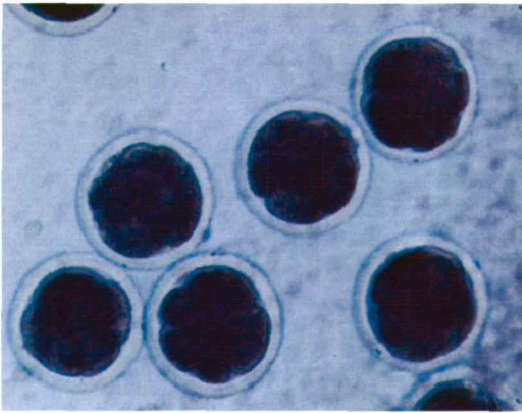


图 3 8 细胞 (200×)

Figure3 8 cell

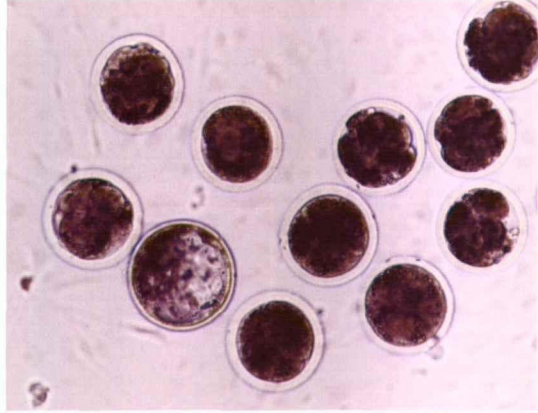


图 4 16-32 细胞(100×)

Figure4 16-32 cell

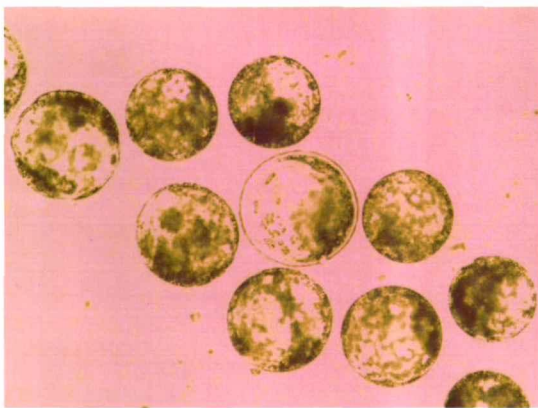


图 5 早期囊胚 (200×)

Figure5 early blastocyst

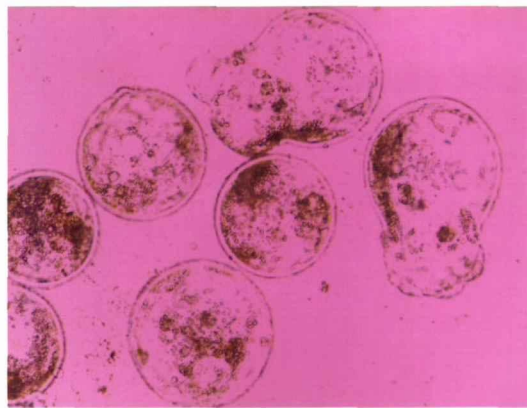


图 6 扩张囊胚(200×)

Figure6 hatching blastocyst

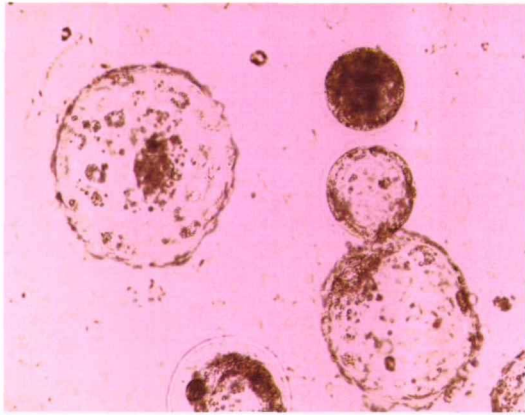


图 7 孵化囊胚 (200×)

Figure7 hatch blastocyst

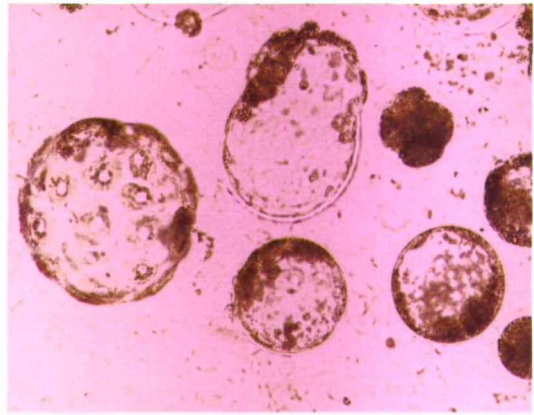


图 8 经冷冻-解冻后发育的囊胚 (200×)

Figure8 post frozen-thawed develop blastocyst

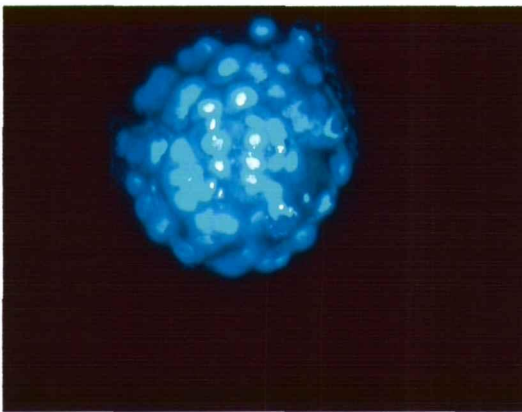


图 9 用荧光染色的早期囊胚内细胞

Figure9 cell number of early blastocyst

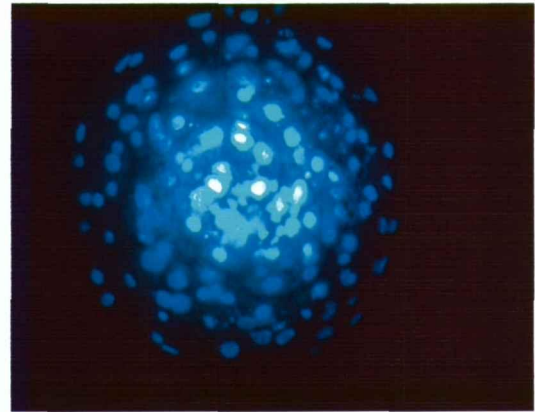


图 10 用荧光染色的孵化囊胚内细胞

Figure10 cell number of hatch blastocyst

致 谢

时光荏苒,紧张而充实的研究生学习生活即将结束。值此论文完成之际,衷心感谢我敬爱的导师卢克焕教授对我三年求学生涯中学术上的教诲、生活上的关心帮助和思想上的启迪。卢老师高尚的人格、幽默风趣的性格、渊博的知识、敏锐的思维和对科研最新发展方向洞悉,无疑将对我今后的做事和做人产生重大的影响,学生将永记卢老师的教诲。在此向我的导师致以深深的敬意!

特别感谢张明教授在实验技能和论文的撰写及修改过程中给予的指导和帮助。张教授严谨的治学和对学生有问必答的态度,给我留下了深刻的印象和极大的鼓舞。

在三年的求学期间特别感谢石德顺老师、卢晟盛老师、江明生老师、周虚教授、蒋如明老师、凌泽继老师、陆阳清老师、谭世俭老师、杨素芳老师、陆凤花老师、王晓丽老师、黄凤玲老师、蒙冰老师、李莲军博士等人在学习和试验技能方面给予的指导。在此向他(她)们表示衷心的感谢!

在学习期间曾到泰国 Mahidol 大学学习及进行部分实验,感谢 Mahidol 大学的 Kanok 教授, Yindee 教授, Oat 及 Tesnee 女士对我试验的大力支持与帮助!

感谢黎宗强、杨小淦、胡传活、任子利、曾有权、梁媛媛、梁兴伟、谢体三、易康乐等师兄师姐在论文和实验中的良好建议与热情帮助。感谢同学付强、陆江、梁琪妹、杨华、刘瑞鑫、成俊平、张平、李日聪、农垚锋、宋立峰、魏凤、吴梦琴等同学在学习生活各个方面的关心和帮助。此外,还要感谢胡慧中、郑海英、李童等 04、05 级的师弟师妹对我实验与论文的帮助和学习生活上的关心照顾!感谢李爱军、李爱英女士对我试验的大力支持与帮助!

非常感谢动科院及研究生处的领导和老师在我三年的学习和生活中给予的关心和支持!

深深感谢我的父母、妹妹及家人多年来从精神和物质上默默支持着我的求学之路,使我在求学生涯中没有后顾之忧。

最后,感谢所有指导、帮助、关心、鼓励我的老师、同学和朋友们!在此仅以本文作为最好的礼物,表达我深深的谢意!

叶丹娜

二 00 六年五月于南宁

攻读硕士学位期间发表的学术论文

梁兴伟, 王武陵, 叶丹娜等, 水牛分离精子体外受精初步研究. 第五届亚洲水牛大会论文集, 2006.