

干细胞因子对小鼠附植前胚胎体外发育的影响

李巧丹¹, 习海涛², 张运海^{1,3,4}, 李运生^{1,3,4}, 方富贵^{1,3,4}, 章孝荣^{1,3,4}, 刘 亚^{1,3,4}

(1. 安徽农业大学 动物科技学院, 安徽 合肥 230036; 2. 温州医学院附属第二医院, 浙江 温州 325000; 3. 安徽地方畜禽遗传资源保护与生物育种省级实验室, 安徽 合肥 230036; 4. 安徽省羊繁育工程技术研究中心, 安徽 合肥 230026)

摘要:为优化胚胎体外培养体系, 提高胚胎体外培养发育率和发育质量, 以昆明小鼠体内受精胚、体外受精胚和孤雌激活胚为研究对象, 研究不同浓度干细胞因子对小鼠不同来源胚胎体外发育的影响。结果表明: 在 KSOM 培养液中, 小鼠自然受精胚、体外受精胚和孤雌激活胚的卵裂率和桑椹胚率均无显著差异($P>0.05$), 但 IVN 胚和 IVF 胚的囊胚发育率及囊胚细胞总数显著高于孤雌激活胚; 培养液中添加不同浓度的干细胞因子对小鼠自然受精胚和孤雌激活胚的卵裂率、桑椹胚率、囊胚发育率和囊胚细胞总数都没有显著的影响($P>0.05$), 但干细胞因子浓度为 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 小鼠体外受精胚的桑椹胚率和囊胚发育率显著高于对照($P<0.05$)。

关键词:干细胞因子; 小鼠; 胚胎; 体外培养

中图分类号: Q813

文献标识码: A

文章编号: 1002-2767(2014)08-0065-04

优化胚胎体外培养体系, 提高胚胎体外培养发育率和发育质量对家畜胚胎工程和人类辅助生殖技术具有重要意义。向培养液中添加某些生长因子是提高胚胎体外发育率和发育质量的重要途径。

小鼠是哺乳动物模式生物, 其自然受精(*in vivo* natural mating, IVN)胚、体外受精(*in vitro* fertilization, IVF)胚及孤雌激活(parthenogenetic activation, PA)胚常用作研究某些生物活性物质或毒素对早期胚胎发育影响的材料。干细胞因子(stemcell factor, SCF)又称肥大细胞生长因子(mastocyte growth factor, MGF)、Kit 配体(KL)或 Steel 因子(SLF), 是由骨髓微环境中的基质细胞产生的一种重要的造血细胞生长因子^[1], 参与了哺乳动物早期胚胎发育的调节。赵振华等^[2]研究表明, SCF 对山羊 IVF 胚的卵裂率无显著影响, 但能显著提高囊胚率; 赵海波等^[3]研究表明, SCF 可促进人卵母细胞发育, 提高胚胎发育潜力; 但 Dhali 研究表明, SCF 对牛胚胎发育

潜力无显著影响^[4]。说明 SCF 对哺乳动物早期胚胎发育的影响较为复杂, 与物种、胚胎来源(IVN胚、IVF胚、PA胚)及添加浓度均有关, 因此有必要研究不同浓度 SCF 对同一物种不同来源胚胎体外发育的影响。该研究旨在探明不同浓度 SCF 对小鼠不同来源早期胚胎发育的影响, 研究 SCF 对人类及其它家畜胚胎早期发育的规律, 进而优化胚胎体外培养体系提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为雌性和雄性清洁级性成熟昆明小白鼠雌性为5~8周, 雄性为10~16周, 购自安徽医科大学实验动物中心。人工控温 $20 \sim 25^{\circ}\text{C}$, 自动光控(12 h 光照, 12 h 黑暗交替), 自由饮水采食。

供试胚胎培养耗材均为 Greiner(German)公司生产; 配制 HTF、KSOM 和孤雌激活液所用化学试剂及 SCF、透明质酸酶(hyaluronidase, HAE)和石蜡油等试剂均为 SIGMA 公司(St. Louis, MO, USA)生产。注射用马绒毛膜促性腺激素(PMSG)及注射用绒促性素(HCG)均购自宁波第二激素厂。

1.2 方法

1.2.1 药剂配制 参照 Quinn 等^[5]方法配制小鼠体外受精液 HTF; 参照 Biggers 等^[6]方法配制化学限定培养液 KSOM; 参照邱小燕等^[7]方法配

收稿日期: 2014-04-11

基金项目: 安徽省自然科学基金资助项目(090413088); 安徽省创新试点省资助项目(12Z010244)

第一作者简介: 李巧丹(1988-), 女, 湖北省随州市人, 硕士, 研究实习生, 从事动物生殖生物技术研究。E-mail: qiao9950@126.com。

通讯作者: 刘亚(1972-), 男, 安徽省亳州市人, 博士, 副教授, 从事动物繁殖技术研究。E-mail: liuya@ahau.edu.cn。

制小鼠卵母细胞孤雌激活液。

1.2.2 小鼠孤雌激活胚胎的获取与培养 小鼠超数排卵、自然受精胚胎的收集与培养及小鼠卵母细胞体外受精参照周娜汝等^[8]方法进行。在注射 hCG 后约 16 h,采用颈椎脱臼法处死超排小鼠,回收卵母细胞;然后置于含 0.25% HAE 的培养液中轻轻吹打,脱去卵丘细胞后,在孤雌激活液中清洗 3 遍,随后转入孤雌激活液中孵育 2~4 h,然后转入胚胎培养滴中培养。

1.2.3 试验设计 将所获得的不同来源的胚胎(IVN 胚、IVF 胚、PA 胚)随机分组,然后分别置于含 0(CK)、50 及 100 ng·mL⁻¹ SCF 的 KSOM 培养液中培养 5 d,分别在培养的第 2 天和第 4 天观察记录小鼠胚胎发育情况,每组试验重复 3~6 次。统计不同浓度 SCF 对小鼠不同来源胚胎卵裂率、囊胚发育率及囊胚细胞数的影响。囊胚细胞染色计数参照曹祖兵等^[9]的方法进行。

卵裂率(%) = 卵裂数/培养胚胎数;桑椹胚

率(%) = 桑椹胚数/培养胚胎数;囊胚发育率(%) = 囊胚数/培养胚胎数

试验所得数据用 SPSS. V13.0 软件进行统计学分析,各项指标均采用 SPSS. V13.0 邓肯式多重 *t* 检验法检验不同处理组之间的差异。

2 结果与分析

2.1 不同来源胚胎发育潜力的比较

由表 1 可见,在 KSOM 培养液中,IVN 胚的卵裂率、桑椹胚率、囊胚发育率和囊胚细胞总数均最高。IVN 胚的卵裂率高于 IVF 胚 3.83 个百分点,高于 PA 胚 9.46 个百分点,但各处理间差异不显著($P>0.05$);IVN 胚的桑椹胚发育率高于 IVF 胚 5.33 个百分点,高于 PA 胚 7.52 个百分点,但各处理间差异不显著($P>0.05$);IVN 胚的囊胚发育和囊胚细胞总数显著高于 PA 胚,但与 IVF 胚差异不显著。

表 1 不同来源胚胎在 KSOM 培养液中发育潜力的比较

Table 1 Comparison on development competence of embryos driven from IVN, IVF and PA in KSOM medium

胚胎来源 Embryos sources	培养数 Number of cultured embryos	卵裂率/% Cleavage rate	桑椹胚率/% Mourla rate	囊胚发育率/% Blastocyst rate	囊胚细胞总数/个 Total cell number of BL
自然受精胚 IVN	104	92.87±3.62 a	44.42±8.45 a	32.70±6.13 a	72.5±1.5 a
体外受精胚 IVF	101	89.04±7.17 a	39.09±2.01 a	35.77±3.24 a	67.0±2.0 a
孤雌激活胚 PA	39	83.41±6.45 a	36.90±8.33 a	14.68±3.71 b	53.0±2.0 b

注:同列不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著($P<0.05$)。下同。

Note: Different lowercases mean significant difference at 0.05 level($P<0.05$). The same below.

2.2 SCF 对小鼠早期胚胎体外发育的影响

2.2.1 不同浓度 SCF 对小鼠自然受精胚胎体外发育的影响 由表 2 可见,SCF 各浓度对小鼠 IVN 胚的卵裂率、桑椹胚率、囊胚发育率和囊胚细胞总数影响均不显著。培养液中 SCF 浓度为

100 ng·mL⁻¹时,小鼠 IVN 胚的卵裂率及囊胚细胞总数与对照组相接近,而桑椹胚率和囊胚发育率略高于对照组;SCF 浓度为 50 ng·mL⁻¹时,小鼠 IVN 胚的卵裂率、囊胚发育率、桑椹胚率和囊胚细胞总数均低于对照。

表 2 不同浓度 SCF 对小鼠自然受精胚胎早期发育的影响

Table 2 Effect of SCF concentrations on the development of IVN embryos

SCF 浓度/ng·mL ⁻¹ Concentration of SCF	培养胚胎数 Number of cultured embryos	卵裂率/% Cleavage rate	桑椹胚率/% Mourla rate	囊胚发育率/% Blastocyst rate	囊胚细胞总数/个 Total blastocyst number
0(CK)	53	85.52±5.82 a	50.89±6.26 a	33.63±6.13 a	73.0±1.0 a
50	36	76.39±5.73 a	47.92±8.59 a	28.47±8.52 a	72.0±1.0 a
100	44	86.34±10.12 a	55.88±12.38 a	41.32±11.30 a	73.5±1.5 a

2.2.2 不同浓度 SCF 对小鼠体外受精胚胎体外发育的影响 由表 3 可见,SCF 不同浓度对小鼠 IVF 胚的卵裂率和囊胚细胞总数影响均不显著。培养液中 SCF 浓度为 50 ng·mL⁻¹时,IVF 胚卵裂

率最高,高于对照 8.61 个百分点。培养液中 SCF 浓度为 100 ng·mL⁻¹时,IVF 胚桑椹胚率和囊胚发育率最高,且与对照差异达显著水平。各处理 IVF 胚囊细胞总数差异不显著。

表 3 不同浓度 SCF 对体外受精胚早期发育的影响

Table 3 Effect of SCF concentrations on the development of IVF *in vitro* embryos

SCF 浓度/ng·mL ⁻¹ Concentration of SCF	培养胚胎数 Number of cultured embryos	卵裂率/% Cleavage rate	桑椹胚率/% Mourla rate	囊胚发育率/% Blastocyst rate	囊胚细胞总数/个 Total blastocyst number
0(CK)	28	89.17±0.83 a	65.00±7.64 a	46.67±3.33 a	67.0±2.0 a
50	46	97.78±2.22 a	74.00±2.37 ab	54.44±5.09 ab	66.0±2.0 a
100	44	95.56±4.44 a	84.17±2.62 b	68.33±5.24 b	66.0±1.0 a

2.2.3 不同浓度 SCF 对小鼠孤雌激活胚体外发育的影响 由表 4 可见,SCF 不同浓度对于小鼠体外培养的 PA 胚的卵裂率、桑椹胚率、囊胚发育率及囊胚细胞总数影响均不显著。当 SCF 浓度

为100 ng·mL⁻¹时,其卵裂率高于对照 3.41 个百分点。SCF 浓度为 50 ng·mL⁻¹时,PA 胚桑椹胚率高于对照 6.19 个百分点。SCF 浓度为 50 及 100 ng·mL⁻¹时,囊胚发育率相接近。

表 4 不同浓度 SCF 对孤雌激活胚胎早期发育的影响

Table 4 Effect of SCF concentrations on the development of PA *in vitro* embryos

SCF 浓度/ng·mL ⁻¹ Concentration of SCF	培养胚胎数 Number of cultured embryos	卵裂率/% Cleavage rate	桑椹胚率/% Mourla rate	囊胚发育率/% Blastocyst rate	囊胚细胞总数/个 Total blastocyst number
0	43	88.86±3.81 a	54.55±6.24 a	22.80±5.20 a	53.0±2.0 a
50	49	87.36±3.50 a	60.74±3.73 a	26.79±3.77 a	54.0±2.0 a
100	56	92.27±4.35 a	47.65±4.90 a	26.17±3.57 a	55.0±2.0 a

3 结论与讨论

IVN 胚、IVF 胚及 PA 胚常用于探索优化胚胎体外培养条件及进行胚胎早期发育研究,Zhang 等^[10]研究表明,猪的 IVF 胚与 PA 胚的体外发育潜力无显著差异。该试验结果表明在 KSOM 培养液中,小鼠 3 种来源的胚胎在卵裂率、桑椹胚率上均无显著差异,但自然胚和 IVF 胚的囊胚率及囊胚细胞总数均显著高于孤雌激活胚。表明不同物种间不同来源的胚胎体外发育潜力可能不同。

Arceci 等^[11]研究表明,小鼠附植前胚胎可持续表达 SCF 受体。Contraestre^[12]等研究表明,小鼠附植前胚胎可分泌 SCF。这些都暗示 SCF 可能通过自分泌或旁分泌调节小鼠胚胎发育。而 Lim 等^[13]则明确了 SCF 可促进体外培养

小鼠的囊胚发育率。Glabowski 等^[14]研究表明,SCF 可通过其受体对暴露于不利环境中的胚胎起保护作用,提高其囊胚发育质量。该研究结果表明,较高浓度的 SCF 可显著提高小鼠 IVF 胚的桑椹胚率和囊胚率,但不能促进 IVN 胚及 PA 胚的卵裂及胚胎发育,对提高囊胚发育质量也没有明显影响,这可能与不同来源胚胎其 SCF 受体表达模式有所差异相关,还需进一步的试验证明。

参考文献:

[1] 叶波平,张玉彬,吴梧桐. 干细胞因子的研究与应用[J]. 药
学进展,2000,24(6):321-326.
[2] 赵振华,周敏敏,钱红娟,等. 不同细胞因子对山羊卵母细胞
体外成熟与早期胚胎发育的影响[J]. 畜牧兽医学报,2009,
40(1):133-137.
[3] 赵海波,何亚绒,李爱莉,等. 卵泡液干细胞因子水平对卵母
细胞发育、受精和卵裂影响的实验研究[J]. 中国计划生育
学杂志,2006(8):475-477.

- [4] Dhali A, Anchamparathy V M, Butler S P, et al. *In vitro* development of bovine embryos cultured with stem cell factor or insulin-like growth factor-I following IVF with semen of two bulls having different field fertility[J]. Anim Reprod Sci, 2009, 116(3-4): 188-95.
- [5] Quinn P, Kerin J F, Warnes G M. Improved pregnancy rate in human *in vitro* fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid[J]. Fertil Steril, 1985, 44(4): 493-498.
- [6] Biggers J D, Summers M C, McGinnis L K. Polyvinyl alcohol and amino acids as substitutes for bovine serum albumin in culture media for mouse preimplantation embryos[J]. Hum Reprod Update, 1997, 3(2): 125-135.
- [7] 邱小燕, 赵先晟, 李跃民. 小鼠不同类型孤雌激活卵的形成及其孤雌胚发育状况的研究[J]. 石河子大学学报: 自然科学版, 2009, 27(4): 449-454.
- [8] 周娜汝, 张宇, 吴蓉花, 等. 巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)对小鼠胚胎体外发育的影响[J]. 安徽农业大学学报, 2013, 40(1): 83-89.
- [9] 曹祖兵, 王维, 陆文昊, 等. 氧分压、培养基及微孔对小鼠胚胎体外发育的影响[J]. 农业生物技术学报, 2010, 18(5): 956-962.
- [10] Zhang K, Wei H X, Zhang Y H, et al. Effects of ghrelin on *in vitro* development of porcine *in vitro* fertilized and parthenogenetic embryos[J]. Journal of Reproduction and Development, 2007, 53(3): 647-653.
- [11] Arceci R J, Pampfer S, Pollard J W. Expression of CSF-1/c-fms and SF/c-kit mRNA during preimplantation mouse development[J]. Dev Biol, 1992, 151(1): 1-8.
- [12] Contramaestre A P, Sifontes F, Marín R, et al. Secretion of stem cell factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by mouse embryos in culture: influence of group culture[J]. Zygote, 2008, 16(4): 297-301.
- [13] Lim J J, Eum J H, Lee J E, et al. Stem cell factor/c-Kit signaling in *in vitro* cultures supports early mouse embryonic development by accelerating proliferation via a mechanism involving Akt-downstream genes[J]. J Assist Reprod Genet, 2010, 27(11): 619-27.
- [14] Glabowski W, Wiszniewska B, Kurzawa R. Protective potential of SCF for mice preimplantation embryos cultured *in vitro* in suboptimal conditions[J]. J Assist Reprod Genet, 2008, 25(8): 395-402.

Effect of Stem Cell Factor on Ectogenesis of Preimplantation Embryo of Mice

LI Qiao-dan¹, XI Hai-tao², ZHANG Yun-hai^{1,3,4}, LI Yun-sheng^{1,3,4}, FANG Fu-gui^{1,3,4}, ZHANG Xiao-rong^{1,3,4}, LIU Ya^{1,3,4}

(1. College of Animal Sciences and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036; 2. The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou, Zhejiang 325000; 3. Anhui Provincial Laboratory for Local Livestock of Poultry Genetic Resource Conservation and Bio-Breeding, Hefei, Anhui 230036; 4. Engineering Research Center of Reproduction and Sheep Breeding in Anhui Province, Hefei, Anhui 230036)

Abstract: In order to optimize *in vitro* culture system of embryo to improve development rate and quality, taking *in vivo* fertilization embryo, *in vitro* fertilization embryo and parthenogenetic activation as research object, the effect of different concentrations of stem cell factor on embryo culture *in vitro* were studied. The results showed that the cleavage rate and morula rate had no significant difference in KSOM, but the blastocyst rate and total blastocyst number derived from PA was less than IVN and IVF. Different concentrations of stem cell factor had no significant effect on cleavage rate, morula rate, blastocyst rate and total blastocyst number. When the concentration of stem cell factor was $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, the morula rate and blastocyst rate were significantly higher than CK.

Key words: stem cell factor; mice; embryo; *in vitro* culture