

培养条件对牛体外受精胚胎核仁及线粒体发育的影响*

刘东军^① 杨东山^① 其木格^② 旭日干^①

(^① 内蒙古大学哺乳动物繁殖生物学与生物技术教育部重点实验室 呼和浩特 010021;

^② 内蒙古医学院电镜中心 呼和浩特 010059)

摘要:牛体外受精胚胎分别在 SOF + FCS、SOF + BSA 和 SOF + PVA 三种培养系统内进行培养,然后分别取三个系统中发育到原核期、2 细胞、4 细胞、8 细胞、桑椹胚和囊胚阶段的胚胎进行透射电镜的观察,了解培养系统中血清和 BSA 的添加与否对胚胎发育过程中核仁和线粒体发育的影响。观察结果表明:与已报道的体内受精胚胎研究结果相比,体外受精胚胎核仁的发育比较迟缓,培养系统中血清及 BSA 的添加与否不会显著影响核仁的发育过程。在 SOF + FCS 和 SOF + BSA 培养系统中线粒体的发育明显滞后,表明培养系统中血清和 BSA 的添加可能是造成这种现象的重要原因。

关键词:牛体外受精胚胎;发育;核仁;线粒体

中图分类号:Q492 **文献标识码:**A **文章编号:**0250-3263(2003)03-38-05

Effects of Culture Conditions on the Development of the Nucleolus and Mitochondria of *in Vitro* Fertilized Bovine Embryos

LIU Dong-Jun^① YANG Dong-Shan^① Qimuge^② BOU Shorgan^①

(^① Key Laboratory of Education Ministry of China for Mammalian Reproductive Biology and Biotechnology, University of Inner Mongolia, Huhhot 010021;

^② Electron Microscope Center of Inner Mongolia Medical College, Huhhot 010059, China)

Abstract: Bovine IVF embryos were cultured in SOF + FCS, SOF + BSA and SOF + PVA respectively. In order to understand the effects of serum supplements or the presence of BSA on the development of embryonic nucleolus and mitochondria, 2-cell, 4-cell and 8-cell embryos, as well as morulae and blastocysts from each culture system, were collected and prepared for observation with a transmission electron microscope. The results indicated that the development of the nucleus was retarded compared to embryos developing *in vivo*, and was not affected by serum supplement or the presence or absence of BSA. The development of mitochondria was significantly delayed when IVF embryos were cultured in SOP + FCS and SOF + BSA.

Key words: Bovine IVF embryo; Development; Nucleolus; Mitochondria

* 内蒙古自然科学基金资助项目(No. 99104-2);

第一作者介绍 刘东军, 39岁,男,副研究员;主要从事哺乳动物繁殖生物学技术研究。

收稿日期:2002-07-25,修回日期:2003-02-20

目前牛体外受精 (*in vitro* fertilization, IVF) 胚胎已广泛应用于畜牧业生产以及转基因动物、克隆动物等相关生物技术的研究中,但 IVF 胚胎与体内受精胚胎相比质量上还有很大差距。这一现象的产生主要是由于体外培养系统的不完善影响了胚胎发育过程中相关基因的表达,使得其生理代谢活动产生异常,最终表现在形态学上的异常。有关牛胚胎发育过程中细胞超微结构的研究最早是在体内胚胎上进行的^[1-3],关于 IVF 胚胎超微结构的研究近几年开始引起关注。

血清及牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 是目前牛 IVF 胚胎体外培养系统中添加的重要成分,最近的研究结果表明,牛 IVF 胚胎与体内受精胚胎相比在超微结构上存在显著差距^[4],培养系统中血清的添加与否会显著影响胚胎的超微结构,并进一步影响到胚胎的生理特性^[5,6]。但目前对 IVF 胚胎的电镜观察大多只选择某一发育阶段,如原核期^[7,8]、桑椹胚或囊胚^[4,9]等。本研究在人工合成输卵管液 (synthetic oviduct fluid, SOF) 系统下,系统观察了培养系统中添加血清、BSA 以及聚乙烯醇 (polyvinyl alcohol, PVA) (PVA 对胚胎发育无作用,在培养系统中只起表面活性剂的作用,以便于胚胎的体外操作^[10]) 对 IVF 胚胎各发育阶段 (原核期~囊胚期) 核仁及线粒体发育的影响,为进一步探讨影响胚胎体外发育的因素提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 卵母细胞的采集、体外成熟及体外受精

将来自屠宰场的屠宰蒙古牛母牛卵巢置于 30~35℃ 生理盐水中带回实验室,用注射器从卵泡中抽取卵母细胞,采卵液为 PBS + 4 mg/ml BSA。将卵母细胞置于成熟培养液中培养 22~24 h,每个 50 μ l 培养小滴内培养 15 个卵母细胞。成熟培养液为: M199 + 10 mmol/L HEPES + 3 AU/ml FSH + 1 μ g/ml E₂ + 10% FCS。将细管冷冻精液在 37℃ 水浴中解冻后用含有 10 mmol/L 咖啡因的 BO 液稀释,然后以 2 000 r/min 离心洗

涤两次,每次 5 min。洗涤后将上浮的活精子用 BO + 20 mg/ml BSA + 2 μ l/ml 肝素稀释一倍,使精子浓度达到 2×10^6 /ml。然后将培养成熟的卵母细胞移入该精子悬浮液制成的微小滴中共同培养 7 h,每 100 μ l 的精液小滴中含有 15 个卵母细胞。

1.2 体外受精卵的体外发育培养 将受精处理后的卵子涡旋震荡去除卵丘细胞,洗涤后分别在 SOF + FCS、SOF + BSA 和 SOF + PVA 培养系统中培养,于受精后 15、24、36、84、120、144 h 采集各系统中发育到原核期、2 细胞、4 细胞、8 细胞、桑椹胚和囊胚期的胚胎。各培养系统每 48 h 更换一次培养液。

1.3 胚胎的固定、包埋、制片和电镜观察 将采集到的胚胎用 3% 戊二醛固定,4℃ 保存。胚胎收集齐后,将戊二醛固定的胚胎经二甲砷酸钠缓冲液清洗,而后用 1% 四氧化锇后固定 1 h,再用巴比妥缓冲液清洗,然后用 50%、60%、70%、80%、90%、100% 的梯度乙醇脱水处理,最后用 Epon812 包埋,包埋块在 37℃ 条件下渗透 24 h 后,再在 60℃ 条件下聚合 48 h。包埋好的样品用 LKB-J 型超薄切片机制备 500Å 超薄切片,然后用醋酸双氧铀和柠檬酸铅双重染色,用 H-700H 日立电子显微镜对切片进行观察拍照。本研究不同培养条件、不同发育阶段的胚胎各观察 5 枚胚胎。

2 结果

本研究对牛 IVF 胚胎在 SOF + FCS、SOF + BSA 和 SOF + PVA 三种培养条件下早期发育各阶段核仁和线粒体的发育情况进行了系统的观察,观察结果如下。

2.1 核仁 三种培养条件下的原核期至 8 细胞期胚胎的核仁均为核仁前体结构,为致密圆形核仁前体结构和环形核仁前体结构 (图版 I: 1, 2)。在 SOF + FCS 的原核期胚胎中发现一环核仁具有多腔 (图版 I: 3), 这种结构的核仁在已报道的体内受精原核期胚胎中也有发现。

三种培养条件下桑椹胚期胚胎的核仁均开始网状化 (图版 I: 4)。囊胚期胚胎的核仁均呈

高度网状化,一个细胞核中常可见多个网状化核仁,显示活跃的转录活性(图版 I:5)。

2.2 线粒体 三种培养条件下原核期胚胎的线粒体无明显差异,线粒体为典型的带帽线粒体,形态多样(图版 I:6)。到2~4细胞期阶段, SOF + FCS 和 SOF + BSA 培养系统内的胚胎线粒体仍多为带帽线粒体,形态多样;在 SOF + PVA 培养系统内的线粒体绝大多数仍为带帽线粒体,但在细胞中也发现了有嵴棒状线粒体的存在(图版 I:7),这种线粒体一般在囊胚中出现。在8细胞阶段 SOF + FCS 和 SOF + BSA 组的线粒体与4细胞期的无明显差别,但在 SOF + PVA 组中开始出现不成熟的有嵴线粒体。在桑椹胚阶段, SOF + FCS 和 SOF + BSA 组的线粒体为椭圆形,但带帽状线粒体很少发现(图版 I:8);SOF + PVA 组的线粒体大部分为圆形,少量为带帽状,但部分线粒体开始出现嵴。胚胎发育至囊胚阶段后,在三种培养系统中线粒体发育的情况大致相同,滋养层细胞内开始出现棒状线粒体,椭圆形线粒体也开始出现嵴(图版 I:9)。内细胞团的线粒体大多仍为圆形,少数呈椭圆形,偶尔可见成熟棒状线粒体。

3 讨论

3.1 核仁的变化 动物胚胎发育过程中,核仁的发生是受精时雌雄配子结合后的胚胎基因组中 rRNA 基因转录的逐步激活过程。Kopečný 等^[11]将牛胚胎中核仁的发生分为四步:①由均质致密的纤维网构成的核仁前体(NPB1);②含单一的中央空泡的环形核仁前体(NPB2);③除中央空泡外周围也出现小的空泡的核仁前体(NPB3);④具纤维-颗粒结构的完全网状化的活性核仁。Baran 等^[12]研究表明 NPB1、NPB2 均不具有转录活性, NPB3 开始出现转录活性,网状化的核仁具有活跃的转录活性。Laurincik 等^[7,8]的研究发现在体内来源的牛原核期胚胎中可见到 NPB1、NPB2、NPB3 三种核仁前体,而体外成熟、体外受精的牛原核期胚胎中只见到 NPB1 和 NPB2。本研究在 SOF + BSA 和 SOF + PVA 的原核期胚胎也只见到了 NPB1 和

NPB2,与他们的结果相符。但在 SOP + FCS 的原核期胚胎中除见到 NPB1 和 NPB2 外,还见到了体内原核期胚胎具有的 NPB3。这一结果表明体外培养条件的不适合会导致核仁发育的减缓,而血清的添加可能对核仁的发育有促进作用,这种作用可能是由血清中 BSA 以外的其它成分产生的。由于血清成分十分复杂,因此对于究竟血清中什么物质可以促进核仁的发育还需进一步探讨。

Baran 等^[12]发现牛体内胚胎核仁中, RNA 最早出现于8细胞晚期的 NPB3 中。本研究除在 SOF + FCS 的原核期胚胎中发现 NPB3 外,在其余各培养系统的原核到8细胞阶段的各个时期都只观察到了 NPB1 和 NPB2,而未发现 NPB3,表明 IVF 胚胎中胚胎基因组激活时间晚于体内胚,这也说明 IVF 胚胎体外培养中产生的发育阻滞现象可能就是由于核仁发育滞后产生的。在本研究各培养系统中,桑椹胚期的核仁开始出现网状化,在囊胚中观察到细胞核中往往具有多个高度网状化的具纤维-颗粒结构的功能性核仁,这一现象与已报道的体内受精胚胎一致,说明此时胚胎基因组已完全激活,细胞代谢活跃,需要大量的核糖体用于蛋白合成。本研究结果显示体外培养条件对核仁发育的影响主要是在8细胞期以前,表明目前的体外培养系统会影响胚胎基因组从母源性基因转录向胚胎基因转录的过程,从而影响胚胎的发育。体外培养过程中一些8细胞期胚胎不能进一步发育可能就是由于这些胚胎的核仁发育受到影响所致。

3.2 线粒体的变化 线粒体是细胞中重要的细胞器,具有很多氧化代谢的酶类,为细胞内代谢能供给场所。在哺乳动物早期胚胎发育过程中线粒体的形态发生较大变化,主要有3种形态的线粒体先后出现:①不成熟线粒体,只在边缘具发育不完全的嵴,呈圆形或帽状;②成熟线粒体,呈椭圆形或棒状,具发达的横嵴;③带空泡的线粒体,被认为是不正常细胞的表现,与细胞凋亡有关。

已有研究表明,体内牛胚胎中桑椹胚以前

均以带帽状线粒体为主,在8细胞期开始出现椭圆形、边缘具发育不完全嵴的线粒体。到桑椹期则主要为圆形基质浅,边缘嵴的数量增加的线粒体。而到了囊胚阶段,则以成熟棒状具横嵴线粒体为主^[3]。本研究观察到在SOF + FCS和SOF + BSA两种体外培养系统下,桑椹胚期以前以带帽状线粒体为主,但直到桑椹期,仍以带帽状线粒体居多。但在SOF + PVA培养系统内,2细胞期的胚胎细胞中就发现了圆形基质浅、边缘具发育不完全嵴的线粒体,在8细胞期这种线粒体的数量增多。在囊胚期三种培养系统中的胚胎细胞中可见到圆形周围嵴开始增加的线粒体,同时有成熟棒状线粒体。观察结果表明在SOF + FCS和SOF + BSA培养条件下,IVF胚胎线粒体的发育速度滞后于体内胚胎,而SOF + PVA培养条件下线粒体的发育与体内胚胎相似。这说明培养系统中血清和BSA的添加可能是影响IVF胚胎线粒体发育的重要因素。

Crosier等^[4]比较了体内来源及体外添加血清及无血清条件下得到的牛桑椹期胚胎,发现体外桑椹期胚胎中成熟线粒体数量少于体内来源的桑椹胚,而添加血清组中线粒体总量及不成熟线粒体的数目又少于无血清系统。Dorland等^[13]也观察到在添加血清培养的羊IVF胚胎中,线粒体退化的比例明显增加,说明血清的添加对线粒体的发育有明显的损害作用。本研究的结果与上述结论大致相同,同时本研究的结果也初步显示,血清对线粒体发育的影响可能主要是由于血清中BSA的成分所造成的。但对于产生这种现象的确切原因仍需进一步研究。

参 考 文 献

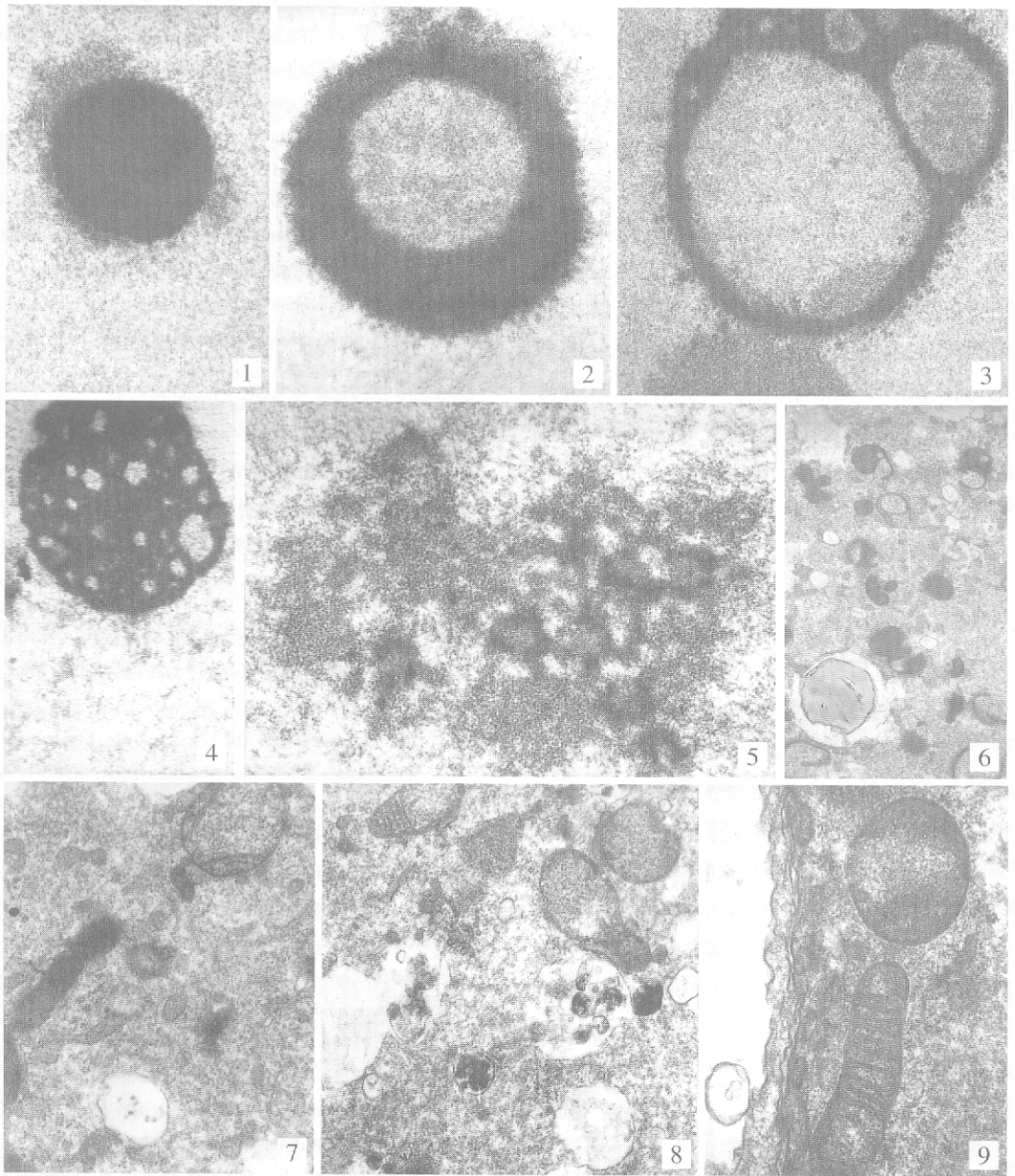
- [1] Brackett B C, Oh Y K, Evans J F, et al. Fertilization and early development of cow ova. *Biol Reprod*, 1980, **23**: 189 ~ 205.
- [2] Mohr L R, Trounson A O. Structural changes associated with freezing of bovine embryos. *Biol Reprod*, 1981, **26**: 787 ~ 790.
- [3] Betteridge K J. The anatomy and physiology of pre-attachment bovine embryos. *Theriogenology*, 1988, **29**: 155 ~ 187.
- [4] Crosier A E, Farin P W, Dykstra M J, et al. Ultrastructural morphometry of bovine compact morulae produced *in vitro* or *in vivo*. *Biol Reprod*, 2000, **62**: 1459 ~ 1465.
- [5] Abe H, Yamashita S, Itoh T, et al. Ultrastructure of bovine embryos developed from *in vitro*-matured and fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or in serum-supplemented medium. *Mol Reprod Dev*, 1999, **53**: 325 ~ 335.
- [6] Abe H, Yamashita S, Staoh T, et al. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Mol Reprod Dev*, 2002, **61**: 57 ~ 66.
- [7] Laurincik J, Kopecny V, Hyttel P. A detailed analysis of pronucleus development in bovine zygotes *in vivo*: ultrastructure and cell cycle chronology. *Mol Reprod Dev*, 1996, **43**: 62 ~ 69.
- [8] Laurincik J, Hyttel P, Baran V, et al. A detailed analysis of pronucleus development in bovine zygotes *in vitro*: cell-cycle chronology and ultrastructure. *Mol Reprod Dev*, 1998, **50**: 192 ~ 199.
- [9] Fair T, Lonergan P, Dinnyes A, et al. Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: effects of method of blastocysts production. *Mol Reprod Dev*, 2001, **58**: 186 ~ 195.
- [10] 刘东军,杨东山,旭日干.牛体外受精卵胚胎在成份确定培养液内的发育.内蒙古大学学报(自然科学版),2001, **32**: 324 ~ 326.
- [11] Kopecny V, Flechon J E, Camous S, et al. Nucleologenesis and the onset of transcription in eight-cell bovine embryo: fine-structural autoradiographic study. *Mol Reprod Dev*, 1989, **1**: 79 ~ 90.
- [12] Baran V, Flechon J E, Pivko J. Nucleologenesis in the cleaving bovine embryo: immunocytochemical aspects. *Mol Reprod Dev*, 1996, **44**: 63 ~ 70.
- [13] Dorland M, Gardner D K, Trounson A O. Serum in synthetic oviduct fluid cause mitochondrial degeneration in ovine embryos. *J Reprod Fertil* (Abstract), 1994, **13**: 25.

刘东军等:培养条件对牛体外受精胚胎核仁及线粒体发育的影响

图版 I

LIU Dong-Jun *et al.*: Effects of Culture Conditions on the Development of the Nucleolus and Mitochondria of *in Vitro* Fertilized Bovine Embryos

Plate I



1.原核期致密圆形核仁前体(SOF + PVA, × 24 000); 2.原核期环形核仁前体(SOF + BSA, × 30 000); 3.原核期多腔环形核仁前体(SOF + FCS, × 15 000); 4.桑椹胚期网状化核仁(SOF + PVA, × 9 000); 5.囊胚期高度网状化核仁(SOF + PVA, × 18 000); 6.原核期带帽线粒体(SOF + FCS, × 6 000); 7.2细胞期有嵴线粒体(SOF + PVA, × 15 000); 8.桑椹胚期椭圆形线粒体(SOF + PVA, × 15 000); 9.囊胚期滋养层线粒体(SOF + FCS, × 21 000)